

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Ana Samodol

802/N

**UTJECAJ PREHRAMBENIH
NAVIKA I STUPNJA
UHRANJENOSTI NA SASTAV
CRIJEVNE MIKROBIOTE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Rumora Samarin Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Diplomski rad izrađen je u okviru znanstveno istraživačkog projekta: Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva (MicroEquilibrium) (IP-2016-06-3509), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Prvo bih se zahvalila svojoj mentorici Ivani Rumori Samarin na savjetima, podršci i opuštenom pristupu. Također, hvala svim djelatnicima Kabineta za bioinformatiku za njihov doprinos u provedbi ovog rada.

Najveću zahvalu dugujem mojoj obitelji, mojim roditeljima, braći i sestri. Zahvaljujući njihovoj podršci, savjetima i šali kada je to bilo potrebno, ustrajnost se isplatila.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su bili dio ovog životnog poglavlja, zahvaljujući kojima su moji studentski dani, uz sve muke i nedaće školovanja prošli u smijehu, radosti i obilju nezaboravnih iskustava.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

UTJECAJ PREHRAMBENIH NAVIKA I STUPNJA UHRANJENOSTI NA SASTAV CRIJEVNE MIKROBIOTE

Ana Samodol, 802/N

Sažetak: Crijevna mikrobiota je složena zajednica mikroorganizama koja čini neizostavni dio gastrointestinalnog trakta svakog pojedinca. Istraživanjima je utvrđeno da sastav i stabilnost crijevne mikrobiote znatno utječu na zdravlje čovjeka. U zdravog pojedinca sastav crijevne mikrobiote je relativno stabilan no crijevna mikrobiota je podložna različitim egzogenim i endogenim čimbenicima, od kojih se posebno izdvaja prehrana. U ovom radu analiziran je sastav crijevne mikrobiote, prehrambene navike, unos energije, makronutrijenata, prehrambenih vlakana te pojedinih skupina namirnica u ispitanika mlađe životne dobi s obzirom na stupanj uhranjenosti. Analizom prehrane i prehrambenih navika nije utvrđena značajna razlika između ispitanika s obzirom na različit stupanj uhranjenosti, izuzev unosa mlijeka i mliječnih proizvoda. Analiza crijevne mikrobiote je pokazala razliku u omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes* između pretilih i pothranjenih skupina, no nije utvrđena značajna poveznica između prehrane i prehrambenih navika sa sastavom crijevne mikrobiote.

Ključne riječi: prehrambene navike, crijevna mikrobiota

Rad sadrži: 59 stranica, 27 slika, 8 tablica, 98 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambenog-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Ivana Rumora Samarin

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr.sc. *Ines Panjkota Krbavčić*
2. Doc.dr.sc. *Ivana Rumora Samarin*
3. Doc.dr.sc. *Jurica Žučko*
4. Doc.dr.sc. *Janko Diminić* (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2018

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Nutrition

EFFECT OF DIETARY HABITS AND BODY MASS INDEX ON INTESTINAL MICROBIOTA

Ana Samodol, 802/N

Abstract: Intestinal microbiota is a complex community of microorganisms which makes an important part of the gastrointestinal tract of the host. Studies have shown that composition and stability of the intestinal microbiota have a significant effect on human health. In a healthy individual, the composition of the gastric microbial is relatively stable, but the intestinal microbiota depends on various exogenous and endogenous factors, of which nutrition is assumed to be the main factor. In this work, the composition of the intestinal microbiota and the intake of energy, macronutrient and dietary fiber as well as food from different groups was analysed and compared among population divided according to the Body Mass Index. While dietary analysis did not confirm a significant difference in diet and dietary habits among subjects of different degrees of nutrition, intestinal microbiotics showed a difference between the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio between the obese and the underweight group. However, no significant correlation has been established between diet and dietary habits with intestinal microbiota.

Keywords: dietary habits, intestinal microbiota

Thesis contain: 59 pages, 27 figures, 8 tables, 98 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Ivana, Rumora Samarin, Assistant professor

Reviewers:

1. *PhD. Ines Panjkota Krbavčić*, Full professor
2. *PhD. Ivana Rumora Samarin*, Assistant professor
3. *PhD. Jurica Žučko*, Assistant professor
4. *PhD. Janko Diminić*, Assistant professor (supstitute)

Thesis defended: 26 September 2018

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA	2
2.1.1. Utjecaj crijevne mikrobiote na funkciju i zdravlje čovjeka	4
2.1.2. Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu	5
2.2. UTJECAJ PREHRAMBENIH NAVIKA NA SASTAV I FUNKCIJU CRIJEVNE MIKROBIOTE	8
2.2.1. Tipovi prehrane i crijevna mikrobiota	8
2.2.2. Utjecaj skupina namirnica, nutrijenta te mikroorganizama unesenih hranom na crijevnu mikrobiotu	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ISPITANICI	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Dijetetička metoda – trodnevni dnevnik prehrane	18
3.2.2. Antropometrijske metode	18
3.2.3. Genomičke metode	20
3.2.3.1. Izolacija i mjerenje koncentracije DNA	20
3.2.3.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena	21
3.2.3.3. Obrada podataka sekvenciranja i analiza mikrobiote	21
3.2.4. Statističke metode	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. OPĆI, ANTROPOMETRIJSKI I BIOKEMIJSKI PODACI	24
4.2. DIJETETIČKI PODACI	29
4.3. PODACI DOBIVENI ANALIZOM CRIJEVNE MIKROBIOTE	41
5. ZAKLJUČCI	48
6. LITERATURA	49

1. UVOD

Crijevna mikrobiota predstavlja kompleksnu zajednicu virusa, bakterija, arhea te eukariota koji naseljavaju gastrointestinalni trakt domaćina. Razvojem novih znanstvenih metoda omogućeno je razumijevanje uloge crijevnne mikrobiote u normalnom radu i funkcioniranju organizma domaćina. Neke od uloga crijevnne mikrobiote vezane su uz poboljšanje probave, jačanje imunoloških reakcija te lučenje endokrinih tvari. U literaturi se stoga crijevna mikrobiota navodi i kao zaboravljeni organ (D'Argenio i Salvatore, 2015).

U zdravog pojedinca sastav crijevnne mikrobiote je relativno stabilan, ali crijevna mikrobiota je podložna različitim egzogenim i endogenim čimbenicima. Čimbenici poput genetike, vrste poroda, dobi, stresa te mnogi drugi mogu utjecati na crijevnnu mikrobiotu, ali ipak se najvažnijim pokretačem funkcije i sastava crijevnne mikrobiote smatra prehrana, jer se već i kratkoročne promjene u prehrani povezuju s promjenama u sastavu i funkciji crijevnne mikrobiote (Sheflin i sur., 2017). Prema tome, prehrana predstavlja jedan od glavnih mogućih mehanizama manipulacije sastava crijevnne mikrobiote, što u budućnosti može biti put terapijske intervencije.

Istraživanja ukazuju na mogućnost postojanja razlike u sastavu crijevnne mikrobiote s obzirom na stupanj uhranjenosti. Kao moguća razlika navodi se udio u bakterijskim koljenima *Firmicutes* i *Bacteroidetes* gdje pretili imaju viši udio *Firmicutes* u odnosu na *Bacteroidetes* (López-Cepero i Palacios, 2015). Kako je stupanj uhranjenosti izravno povezan uz prehranu, a povezan je i sa sastavom crijevnne mikrobiote, prilikom istraživanja crijevnne mikrobiote i prehrane treba uzeti u obzir i stupanj uhranjenosti pojedinca.

Pozitivan utjecaj crijevnne mikrobiote na zdravlje ljudi je vezan uz stabilnost njezina sastava, stoga je cilj trenutnih istraživanja spoznati dugoročan utjecaj prehrambenih navika na crijevnnu mikrobiotu. Definiranjem prehrambenih obrazaca kojim bi se povećala bakterijska raznolikost, poticanjem rasta poželjnih vrsta, moglo bi se blagotvorno djelovati na zdravstveni status pojedinca, a dugoročno bi se moglo utjecati na smanjenje rizika od kroničnih bolesti.

Cilj ovog rada je ispitati prehrambene navike osoba mlađe životne dobi različitog stupnja uhranjenosti te utvrditi postoje li razlike koje bi bilo moguće povezati s potencijalnim razlikama u sastavu crijevnne mikrobiote. Dobivenim rezultatima omogućit će se bolje razumijevanje poveznice crijevnne mikrobiote i prehrambenih navika u zdravoj populaciji mlađe životne dobi.

2. TEORIJSKI DIO

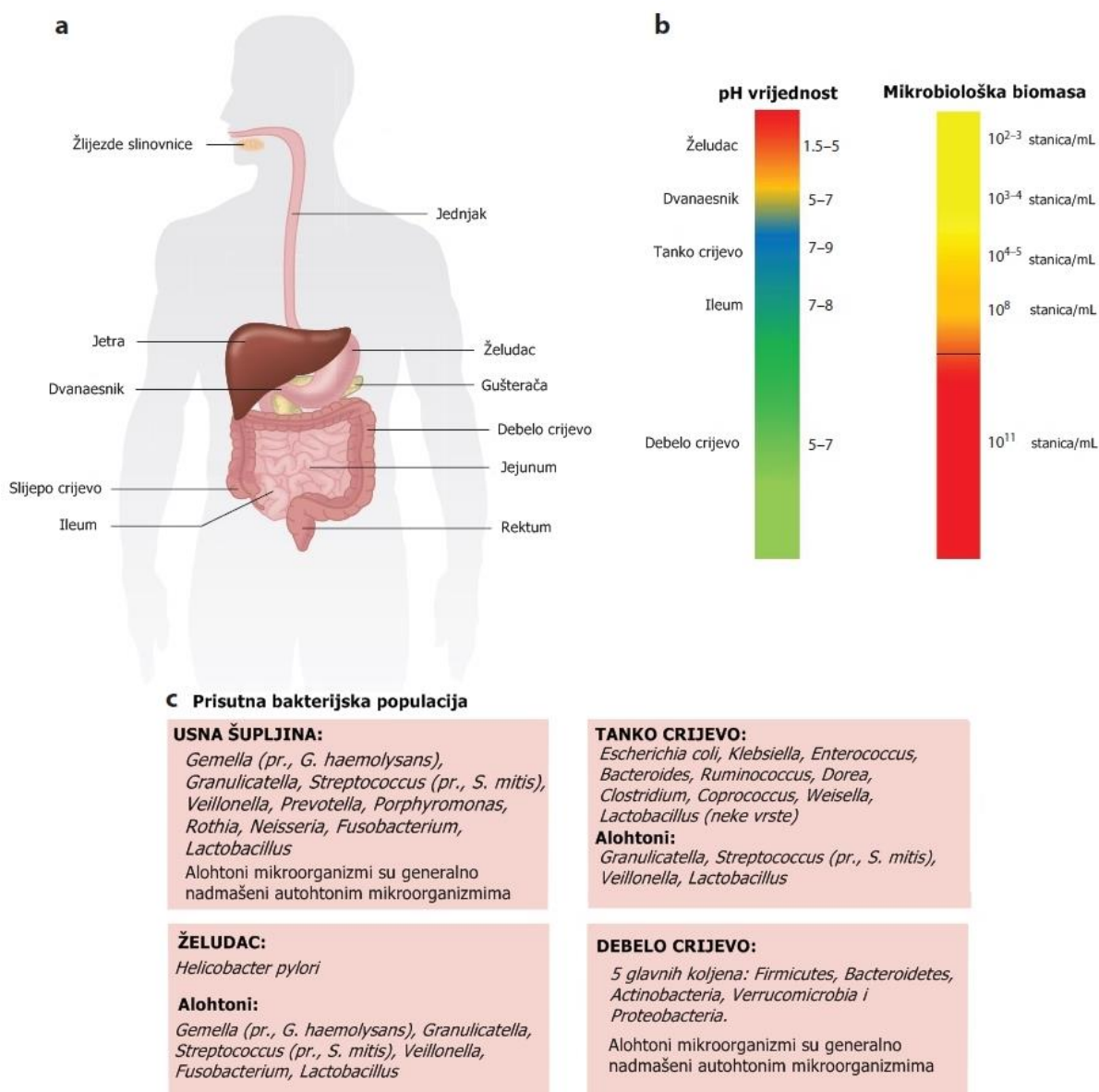
2.1. CRIJEVNA MIKROBIOTA

Mikrobiota je pojam koji se odnosi na zajednicu mikroorganizama koja uključuje bakterije, arheje, viruse i neke jednostanične eukariote koji žive u specifičnoj okolini (D'Argenio i Salvatore, 2015). Crijevna mikrobiota se definira kao kompleksna zajednica 100 bilijuna (10^4) bakterija i arheja od čega su dominantne, s više od 90 %, bakterije koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Tremaroli i Bäckhed, 2012). Zanimljivo je da debelo crijevo nastanjuje više od 70 % svih mikroorganizama prisutnih u ljudskom tijelu jer ono može biti bogato molekulama koje su hranjive tvari nekim mikroorganizmima pa kao takvo predstavlja glavno mjesto za mikrobiološku kolonizaciju (Sekirov i sur., 2010).

Dugo se vjerovalo kako mikrobnu populaciju stječemo tek rođenjem, no sve veći broj novijih istraživanja upućuje da se crijevna mikrobiota počinje uspostavljati *in utero*, odnosno prije rođenja (Walker i sur., 2017; Hollister i sur., 2014). Istraživanje iz 2016. godine koje je provedeno na 15 parova (majka-dijete) upućuje na prisutnost rodova *Proteobacteria* (*Enterobacter* i *Escherichia/Shigella*), *Propionibacterium* i *Enterobacteriaceae* u posteljici i plodnoj vodi, a kolonizirana je mikrobna populacija ujedno bila slična onoj zabilježenoj u mekoniju (prva stolica) novorođenčeta (Collado i sur., 2016). Nakon rođenja crijevna mikrobiota se brzo razvija i do treće godine djetetova života mikrobna populacija nalikuje 40-60 % onoj u odrasloj dobi (Hollister i sur., 2014, Yatsunenko i sur., 2012).

Osim u debelom crijevu mikroorganizmi koloniziraju cijeli gastrointestinalni (GI) trakt zdravih pojedinaca.

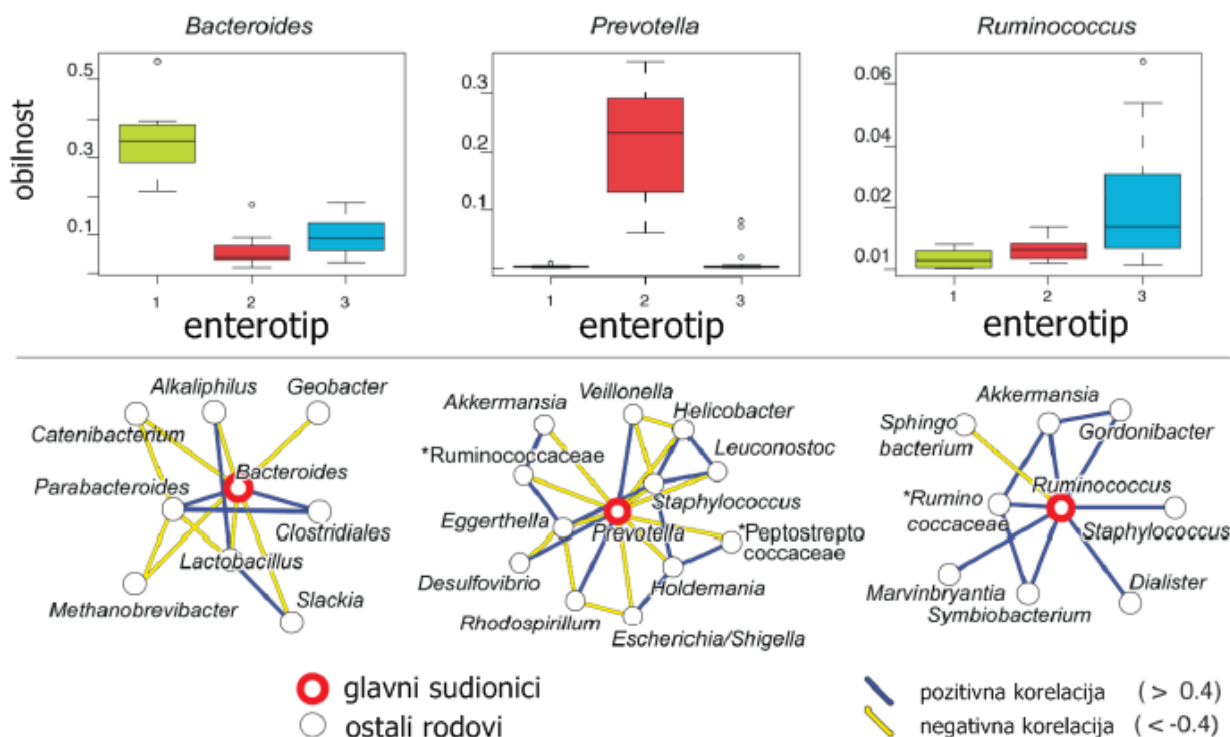
Sastav i koncentracija dominantnih mikrobnih vrsta u GI traktu zdravog čovjeka prikazani su na slici 1. Specifična koncentracija i vrsta bakterija ovise o mikro okolišnim čimbenicima poput pH, kisika i dostupnih nutrijenata. Gornji dio GI trakta sadrži manju koncentraciju bakterija i to pretežito aerobnih, za razliku od donjeg dijela GI trakta gdje prevladavaju veće koncentracije, ponajviše anaerobnih bakterija. Zonu prijelaza iz pretežito aerobnih u anaerobne bakterije predstavlja terminalni ileum (DiBaise i sur., 2008). Gornji dio GI trakta bogat je bakterijama iz koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria*, roda *Lactobacillus* dok donji dio GI trakta pretežito nastanjuju bakterije koljena *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i vrste *Akkermansia munciniphila* (Meijnikman i sur., 2017).



Slika 1. Raspodjela mikroorganizama kroz gastrointestinalni trakt. a) Osnovni dijelovi probavnog sustava. b) Promjena pH vrijednosti u probavnom traktu (lijevo) i koncentracija bakterijskih stanica po mL (desno). c) Dominantni tipovi autohtonih i alohtonih mikroorganizama (prema Walter i Ley, 2011).

S obzirom na dominantne rodove (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*) prisutne u crijevnoj mikrobioti većina pojedinaca može se svrstati u jedan od tri osnovna enterotipa (Clemente i sur., 2012). Filogenetske razlike (sastav bakterija) navedena tri enterotipa prikazane su na slici 2, ali je važno naglasiti kako ti tipovi nisu strogo definirani. Svaka vrsta enterotipa je kompleksna i ne može se dovesti u vezu sa specifičnim svojstvima pojedinca

poput dobi, spola, geografskog podrijetla i indeksa tjelesne mase (ITM) (Arumugam, 2011). Podjela ljudske crijevne mikrobiote na tri osnovna enterotipa je pokušaj lakšeg razumijevanja razlika crijevne mikrobiote u zdravlju i bolesti (Knights i sur., 2014) te se još uvijek raspravlja o njenoj valjanosti (Gérard, 2016).



Slika 2. Filogenetske razlike između tri osnovna enterotipa (prema Arumugam, 2011).

Iako bi crijevna mikrobiota u zdravih ljudi trebala biti sličnog sastava ipak se ne može strogo definirati sastav crijevne mikrobiote jer svaki pojedinac ima unikatnu, vlastitu mikrobiotu (Meijnikman i sur., 2017).

2.1.1. Utjecaj crijevne mikrobiote na funkciju i zdravlje čovjeka

Prisutnost crijevne mikrobiote u ljudskom organizmu, kao i njihova potencijalna uloga u zdravlju i bolesti odavno je poznata, no tek s razvojem molekularnih metoda se otkiva važnost cijevne mikrobiote (Tuddenham i Sears, 2015). Zbog toga se crijevna mikrobiota često naziva „zaboravljenim organom“ (D'Argenio i Salvatore, 2015). Danas su poznati mnogi poželjni utjecaji crijevne mikrobiote na organizam i većina njih se može svrstati u zaštitnu, metaboličku (Tuddenham i Sears, 2015) ili endokrinu funkciju u organizmu (Clarke i sur., 2014). Potencijal crijevne mikrobiote kao „endokrinog organa“ nadilazi ostale žlijezde. Za

razliku od endokrinih organa koje luče jednu ili manji broj endokrinih tvari crijevna mikrobiota može lučiti mnogobrojne hormone. Biokemijski kapacitet proizlazi iz bioraznolikosti njezinog sastava (Clarke i sur., 2014).

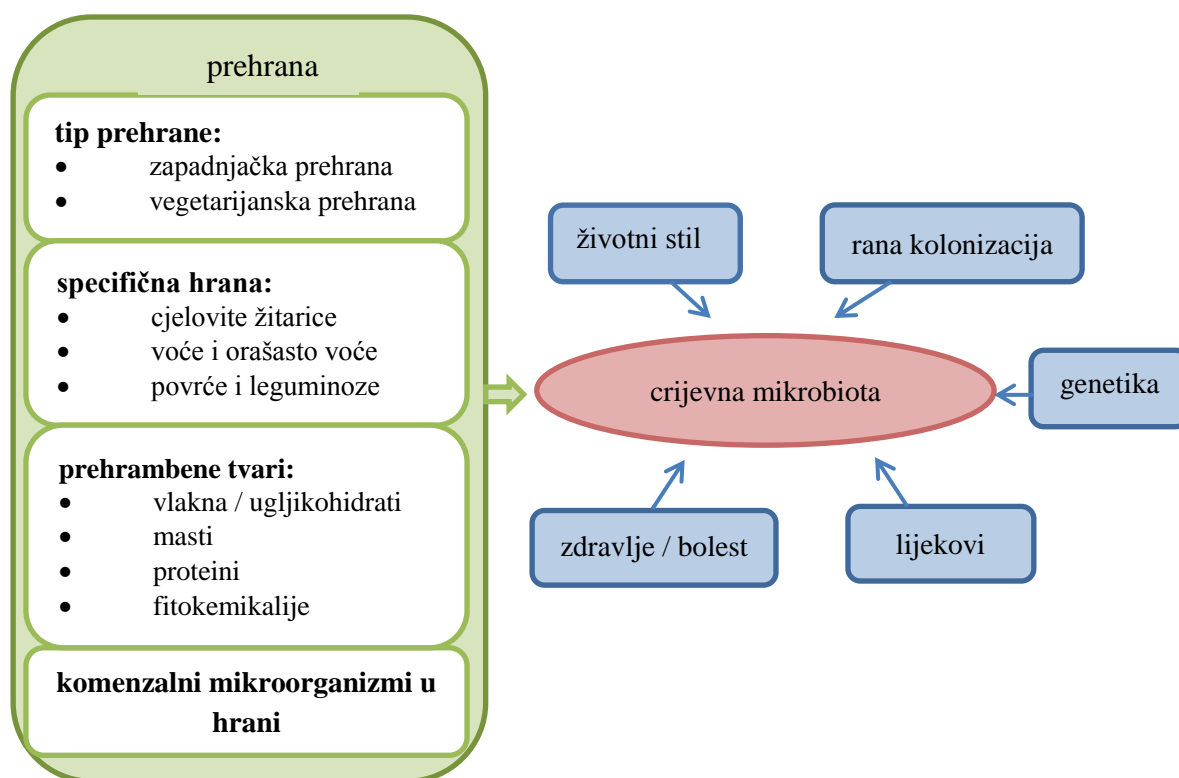
Gastrointestinalni trakt je primarno mjesto interakcije između imunološkog sustava domaćina i patogenih ili simbiotski mikroorganizama. Simbiotske bakterije ključne su za zaštitu domaćina jer sprečavaju kolonizaciju patogenih mikroorganizama te sudjeluju u izgradnji intestinalnog epitela. Uz to određene značajke i funkcije imunološkog sustava sisavaca ovise o interakciji s crijevnom mikrobiotom (Round i Mazmanian, 2014).

Crijevna mikrobiota utječe na metabolizam domaćina, pojačava metaboličku sposobnost domaćina i regulira njegov metabolizam (Tuddenham i Sears, 2016). Mikroorganizmi debelog crijeva su važni za metabolizam mikronutrijenata, makronutrijenata te nekih toksina. Za razliku od metabolizma domaćina neki mikroorganizmi debelog crijeva šifriraju proteine za razgradnju neprobavljivih ugljikohidrata (D'Argenio i Salvatore, 2015) oslobađajući pritom kratkolančane masne kiseline bitne za imunološki sustav (Tuddenham i Sears, 2016). Također mikroorganizmi razgrađuju proteine na aminokiseline, koje dalje koriste za sintezu signalnih molekula i antimikrobnih peptida, a važni su i u sintezi vitamina K, B₁₂ i biotina te apsorpciji magnezija, kalcija i željeza (Tuddenham i Sears, 2016).

Uzimajući u obzir utjecaj crijeвне mikrobiote na domaćina može se zaključiti kako je ona važna za održavanje zdravlja odrasle osobe. Poremećaj normalne ravnoteže između crijeвне mikrobiote i domaćina povezuje se s mnogim bolestima kao što su: pretilost, malnutricija, upalna bolest crijeva, neurološki poremećaji i rak (Lozupone i sur., 2012). Ravnoteža koristi i štete za domaćina stoga ovisi o cjelokupnom stanju mikrobiološke zajednice u smislu njegove distribucije, raznolikosti te sastava vrsta (Flint i sur., 2012).

2.1.2. Čimbenici koji utječu na crijevnu mikrobiotu

Crijevna mikrobiota zdravog čovjeka je stabilna, međutim do promjene u sastavu može doći kao posljedica djelovanja određenih čimbenika (Bell, 2015). Sastav crijeвне mikrobiote je pod utjecajem okolišnih čimbenika, što uključuje korištenje antibiotika, prehranu, higijenu te životne navike (Sommer i Bäckhed, 2013), a osim toga utjecaj na crijevnu mikrobiotu imaju dob te genetika (Lozupone i sur., 2012), što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Čimbenici koji utječu na sastav crijeвне mikrobiote s posebnim naglaskom na prehranu (prema Graf i sur., 2015).

Liječenje antibioticima ima brz i dug utjecaj na sastav crijeвне mikrobiote. Svega nekoliko dana korištenja antibiotika može izazvati stanje dugotrajne disbioze, što se očituje smanjenjem raznolikosti crijeвне mikrobiote, gubitkom značajnih mikroorganizama te konstantnim metaboličkim promjenama koje dovode do smanjene rezistencije na intestinalne patogene (Lange i sur., 2016). Gubitak prvotnog sastava crijeвне mikrobiote može izazvati ozbiljne posljedice na zdravlje kao što su upalna bolest crijeva, sindrom iritabilnog crijeva te pojava pretilosti u djece (Bell, 2015).

Najveće promjene u sastavu crijeвне mikrobiote zbivaju se u ranim godinama života (Yatsunenko i sur., 2012). Crijevna mikrobiota novorođenčadi najviše je podložna promjenama koje mogu biti uvjetovane uzimanjem antibiotika, vrstom poroda te dojenjem. Ipak, još nije poznato kakav utjecaj imaju različitosti crijeвне mikrobiote u ranijoj životnoj dobi na crijeвnu mikrobiotu odraslog čovjeka (Dominguez-Bello i sur., 2010). Posljednjih godina proučavaju se specifičnosti crijeвне mikrobiote starije populacije radi razumijevanja promjena koje se zbivaju s godinama, a povezuju se s utjecajem na zdravlje. Pokazalo se da je crijevna mikrobiota starijih osoba drugačija u odnosu na crijeвnu mikrobiotu odraslog čovjeka

te je više podložna pojedinačnim razlikama (Rodríguez i sur., 2015). Cilj suvremenih istraživanja je naučiti kako manipulirati crijevnom mikrobiotom te u konačnici utjecati na zdravlje.

Uloge gena i okolišnih čimbenika, posebice prehrane, na stvaranje crijevne mikrobiote još uvijek su nejasne dijelom jer se ti čimbenici međusobno isprepliću. Proučavanjem crijevne mikrobiote srodnika, kao što su blizanci, te majka i kćer, potvrđena je sličnost u sastavu crijevne mikrobiote srodnika, što prvotno upućuje da genetičko naslijeđe ima utjecaj na crijevnu mikrobiotu (Lozupone i sur., 2012). Također, nedavno istraživanje na 977 pojedinaca, uključujući jednojajčane i dvojajčane blizance, pokazalo je veće sličnost crijevne mikrobiote među blizancima u odnosu na osobe koje nisu u srodstvu te veću sličnost kod jednojajčanih nego dvojajčanih blizanaca (Goodrich i sur., 2014). Turnbaugh i sur. (2009) su ustvrdili kod jednojajčanih blizanaca sličnost mikrobiote manju od 50 %, uzimajući u obzir bakterijske taksonomske grupe na razini vrste (Clemente i sur., 2012).

Čimbenici životnog stila, pušenje i nedostatak tjelesne aktivnosti mogu značajno utjecati na debelo crijevo i potencijalno crijevnu mikrobiotu te su čimbenici rizika raka kolorektalnog područja (Conlon i Bird, 2015). Nadalje, pušenje značajno utječe na razinu *Bacteroides-Prevotella* u zdravih ispitanika i ispitanika s Crohnovom bolešću što upućuje na moguću vezu promjene sastava crijevne mikrobiote izazvane pušenjem s rizikom od razvoja Crohnove bolesti (Benjamin i sur. 2011). Dosadašnji rezultati ukazuju da vježbanje može imati pozitivan utjecaj na bioraznolikost crijevne mikrobiote, no razmjer djelovanja teško je odrediti jer je vježbanje često popraćeno ekstremnim prehranbenim obrascima (Clarke i sur., 2014). Stres je još jedan značajan čimbenik životnog stila koji se povezuje s crijevnom mikrobiotom, smanjuje koncentraciju *Lactobacillus* bakterija (Conlon i Bird 2015).

Navedeni čimbenici poput genetike, vrste poroda, dobi, stresa te mnogi drugi mogu utjecati na crijevnu mikrobiotu, no ipak najvažnijim pokretačem funkcije i sastava crijevne mikrobiote smatra se prehrana jer se kratkoročne promjene u prehrani povezuju s promjenama u sastavu i funkciji crijevne mikrobiote (Sheflin i sur., 2017). U posljednje vrijeme, povećava se broj radova koji prehranu ističu kao glavni okolišni čimbenik utjecaja na crijevnu mikrobiotu (Clarke i sur., 2012).

2.2.UTJECAJ PREHRAMBENIH NAVIKA NA SASTAV I FUNKCIJU CRIJEVNE MIKROBIOTE

Prehrambene navike su jedan od čimbenika životnog stila koji igraju važnu ulogu u nastanku i napretku nekih kroničnih bolesti (Jelinić i sur., 2009) kao što su: ateroskleroza, koronarna bolest, dijabetes, hipertenzija pa i razne maligne bolesti (Koprivnjak, 2008). Većina istraživanja o utjecaju prehrane na zdravlje usmjereno je na izravnu interakciju prehrambenih komponenti i sustava domaćina, no za potpuniju sliku sve je važnije uzeti u obzir prehrambene učinke na crijevnu mikrobiotu (Sheflin i sur., 2017). Do danas, istraživanja koja povezuju hranu i crijevnu mikrobiotu bazirala su se na povezivanju tipa prehrane ispitanika, cjelovite hrane/prehrane ili sastojaka hrane sa sastavom crijevne mikrobiote (Graf i sur., 2013).

2.2.1. Tipovi prehrane i crijevna mikrobiota

Kako bi se prehrana mogla povezati sa crijevnom mikrobiotom uspoređivani su specifični tipovi prehrane ispitanika te su bilježene razlike u njihovoj crijevnoj mikrobioti. Nekoliko studija uspoređivalo je crijevnu mikrobiotu osoba sa zapadnjačkim tipom prehrane (Europa i Sjedinjene Američke Države) u odnosu na osobe s tradicionalnim tipom prehrane karakterističnim za ruralna područja (Afrika i Južna Amerika) (Filippo i sur., 2010; Yatsunenکو i sur., 2012; Ou i sur., 2013; Schnorr i sur., 2014), a tek nekolicina istraživanja proučavala je razlike u crijevnoj mikrobioti vegetarijanaca, vegana i omnivora (Liszt i sur., 2009; Kabeerdoss i sur., 2012; Matijasic i sur., 2014). Detaljan pregled dosadašnjih istraživanja i njihovih rezultata nalazi se u tablici 1.

Zapadnjačku prehranu karakterizira niski unos vlakana te visoki udio masti i rafiniranih ugljikohidrata u usporedbi s tradicionalnom prehranom koja je bogata vlaknima i složenim ugljikohidratima (Graf i sur., 2015). Tradicionalna prehrana ruralnog područja povezana je većom koncentracijom bakterija roda *Prevotella* (Filippo i sur., 2010; Yatsunenکو i sur., 2012; Ou i sur., 2013; Schnorr i sur., 2014) i *Xylanibacter* (Filippo i sur., 2010). Uz to, zamijećen je porast *Succinivibrio* i *Treponema* bakterija u Afričkoj populaciji (De Fillipo i sur, 2010; Ou i sur., 2013; Schnorr i sur., 2014). Navedene bakterije posjeduju visoki potencijal za razgradnju vlakana što je bitno za prehranu baziranu na ugljikohidratima (Graf i sur., 2015). Zapadnjačka prehrana okarakterizirana je porastom bakterija *Bacteroides* te nižom bioraznolikošću što se povezuje s većim udjelom zasićenih masti i proteina (Wu i sur., 2011).

Za razliku od zapadnjačke prehrane, vegetarijanska prehrana obiluje prehrambenim vlaknima, fitokemikalijama, magnezijem, kalijem folatima te ima niži unos natrija. Razlike u

unosu mikronutrijenata i makronutrijenata između zapadnjačke i vegetarijanske prehrane izravno su povezane s pojavom kroničnih oboljenja, ali rezultiraju i razlikom u sastavu crijevne mikrobiote. Za razliku od omnivora, vegetarijanci pokazuju veću bakterijsku raznolikost te veći omjer *Prevotella-Bacteroides* grupa (Sheflin i sur, 2017). Prehranu omnivora karakterizira veća količina bakterije *Clostridium klaster XIVa* (Matijasic i sur., 2014; Kabeerdoss i sur., 2012), bakterije sinteze butirata (Graf i sur., 2015). Butirat je jedna od kratkolančanih masnih kiselina koja služi kao glavni izvor metaboličke energije za kolonocite, a osim toga važna je za strukturu sluznice crijeva, utječe na inflamatorne reakcije te regulira stabilnost genoma (Conlon i sur., 2015).

Tablica 1. Prikaz istraživanja provedenih u svrhu identifikacije specifičnosti crijevne mikrobiote u odnosu na tip prehrane (Prema Graf i sur., 2015; Sheflin i sur., 2017).

Istraživanja	Usporedba tipa prehrane	Ispitanici	Rezultati
De Filippo i sur. (2010)	Zapadnjačka prehrana te prehrana ruralnih područja	Afrička i Europska djeca	Prehrana ruralnih područja: ↑ gotovo 50% više koljena <i>Bacteroidetes</i> posebice (rod: <i>Prevotella</i> i <i>Xylanibacter</i>) ↑ porast <i>Succinivibrio</i> i <i>Treponema</i> ↓ koljeno <i>Firmicutes</i>
Yatsunenko i sur. (2012)		Djeca i odrasli iz amazonskog dijela Venecuele i Malezije te djeca i odrasli iz SAD-a	Prehrana ruralnih područja: ↑ rod <i>Prevotella</i>
Ou i sur. (2013)		Afrikanci te Afriko-Amerikanci	Prehrana ruralnih područja: ↑ rod <i>Prevotella</i> ↑ porast <i>Succinivibrio</i> i <i>Treponema</i>
Schnorr i sur. (2014)		Hadza- Lovačko sakupljačko pleme iz Tanzanije i Talijani	Prehrana ruralnih područja: ↑ rod <i>Prevotella</i> ↑ porast <i>Succinivibrio</i> i <i>Treponema</i>
Liszt i sur. (2009)	Vegetarijanska prehrana i prehrana omnivore	Vegetarijanci i omnivore	Vegetarijanska prehrana: ↑ roda <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Clostridium klaster IV</i>
Kabeerdoss i sur. (2012)		Indijke ruralnih predjela te Indijke s Zapadnjačkim tipom prehrane	Vegetarijanska prehrana: ↓ <i>Clostridium klaster XIVa</i> posebno <i>Roseburia-E. rectale</i> ↑ <i>Clostridium leptum</i> i <i>F. prausnitzii</i>
Matijasic i sur. (2014)		Vegetarijanci i omnivore (Slovenija)	Vegetarijanska prehrana: ↓ <i>Clostridium klaster XIVa</i> ↑ omjer <i>Bacteroides</i> - <i>Prevotella</i> grupe ↑ roda <i>Bacteroides</i> ↑ vrsti <i>Bacteroides thetaiota</i> <i>Clostridium clostridioforme</i> i <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Wu i sur. (2016)		Vegetarijanci i omnivore (SAD)	Slična crijevna mikrobiota između grupa.
Zimmer i sur. (2012)	Lakto-ovo vegetarijanska, veganska prehrana te prehrana omnivore	Lakto-ovo vegetarijanci, vegani i omnivore	Veganska prehrana naspram prehrane omnivora: ↓ <i>Bacteroides</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> Veganska prehrana naspram vegetarijanske prehrane: ↓ pH stolice

2.2.2. Utjecaj skupina namirnica, nutrijenta te mikroorganizama unesenih hranom na crijevnu mikrobiotu

S obzirom na veliku bioraznolikost crijevne mikrobiote, potreba za prehranbenim tvarima može biti raznolika. Ciljane tvari iz hrane koje služe kao hrana crijevnoj mikrobioti su neprobavljive tvari, a veća varijabilnost raspoloživih supstrata rezultira većom raznolikošću tj. većom stabilnošću crijevne mikrobiote (Ercolini i Fogliano, 2018).

Glavna komponenta hrane koja utječe na crijevnu mikrobiotu, sastav i aktivnost svakako su prehrambena vlakna (Ercolini i Fogliano, 2018). Prema definiciji prehrambena vlakna su složeni ugljikohidrati građeni od deset i više monomernih jedinica te se ne mogu razgraditi enzimima tankog crijeva (Jones, 2014). Njihova razgradnja odvija se debelom crijevu djelovanjem mikroorganizama (Graf i sur., 2015). Kako su vlakna heterogena skupina spojeva, raznolikost u njihovim kemijskim strukturama može poslužiti za selekciju mikroorganizama u probavnom sustavu (Hamaker i Tuncil, 2014). Primjerice, istraživanje trojednog unosa inulina je rezultiralo značajnim porastom *Bifidobacterium* (Costabile i sur., 2010), dok je kroz isti vremenski period unos polidekstroze utjecao na porast bakterija *Clostridiaceae* te smanjenje *Eubacteriaceae* (Hooda i sur., 2012).

Uz prehrambena vlakna potencijalni utjecaj na crijevnu mikrobiotu imaju polifenoli. Prehrambeni polifenoli povezuju se s mnogobrojnim pozitivnim zdravstvenim učincima poput smanjenog rizika od raka i kardiovaskularnih oboljenja (Conlon i Bird, 2015). Put djelovanja polifenola većinom se povezuje s antioksidativnim i protupalnim utjecajem njihovih metabolita. Neke bioaktivne komponente mogu nastati u debelom crijevu aktivnošću crijevne mikrobiote međutim biokemijski procesi nisu u potpunosti istraženi (Conlon i Bird, 2015) pa je teško povezati pozitivan utjecaj polifenola na zdravlje s crijevnom mikrobiotom. Uz to, individualna razlika u sastavu crijevne mikrobiote može biti razlog različitog kapaciteta metabolizma polifenola (Gross i sur., 2010).

Osim komponenti hrane neki mikroorganizmi mogu se unositi kao dodatak hrani/prehrani (Mishra i sur., 2015). Probiotici su definirani kao živi mikroorganizmi koji, kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama, daju zdravstvenu dobrobit domaćinu. Najčešće konzumirani probiotici pripadaju rodu *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Mehanizmi kojima probiotici mogu poboljšati zdravlje domaćina uključuju jačanje funkcije mukozne barijere, smanjenje propusnosti sluznice za mikroorganizme i metabolite, povećanje proizvodnje mukoznih antitijela, jačanje integriteta epitela te djeluju kao izravni antagonisti patogenim

mikroorganizmima. Točan razmjer utjecaja probiotika je nepoznat zbog različitih rezultata istraživanja. U obzir također treba uzeti razlike u metodologiji istraživanja te razlike između ispitivanih skupina (Conlon i Bird, 2015).

Maksimum iskoristivosti određene prehrambene komponente ne ovisi isključivo o koncentraciji njezina unosa već je uvjetovana ukupnim sastavom hrane (Ercolini i Fogliano, 2018), stoga prilikom promatranja utjecaja određene komponente te njezine veze s crijevnom mikrobiotom treba uključiti pojedine skupine namirnica. Svaka skupina namirnica, kao i pojedinačne namirnice unutar skupine, je specifična s obzirom na sastav. Istraživanja koja su do sada provedena su bila usmjerena na namirnice bogate spojevima s prebiotičkim djelovanjem ili spojevima čiji metaboliti se povezuju sa zdravstvenim statusom, a mogu nastati pod djelovanjem crijevne mikrobiote.

2.2.2.1. Cjelovite žitarice

Cjelovite žitarice spadaju u skupinu namirnica bogatih prehrambenim vlaknima (Graf i sur., 2015). Mnoge zdravstvene prednosti koje se pripisuju prehrambenim vlaknima su posljedica njihove fermentacije crijevnom mikrobiotom i metabolita nastalih tim putem (Conlon i Bird, 2015). Kontrolnim studijama koje su ispitivale utjecaj cjelovitih žitarica na crijevnu mikrobiotu se ustvrdio prebiotički utjecaj cjelovitih žitarica (Costabile i sur., 2008; Carvalho-Wells i sur., 2010). Trodnevna konzumacija cjelovitih žitarica za doručak je rezultirala povećanjem količine bifidobakterija u kontrolnoj skupini te se udio *Lactobacillus/Enterococcus* povećao u oba intervencijska razdoblja (žitarice bogate cjelovitim žitaricama i placebo žitarice) (Costabile i sur., 2008). Slične rezultate objavili su Costabile i sur. (2010) koristeći pšenične mekinje kao ispitivani uzorak. Zamijećen je porast bakterija *Bifidobacterium spp.* *Lactobacillus-Enterococcus* grupa u intervencijskoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

2.2.2.2. Voće i povrće

Voće i povrće važan su izvor flavonoida, spojeva koji se smatraju odgovornima za pozitivne zdravstvene učinke prehrane bogate biljnim namirnicama (Klinder i sur., 2016). Klinder i sur. (2016) su u svom radu proučavali povezanost pozitivnog utjecaj prehrambenih vlakana i/ili flavonoida iz voća i povrća sa sastavom crijevne mikrobiote. Istraživanje je pokazalo inhibitornu ulogu voća i povrća na rast potencijalno patogene *Clostridium leptum* bakterije.

U skupini voća je pobliže ispitivan utjecaj konzumacije jabuka (Shinohara i sur., 2010), banana (Mitsou i sur., 2011) te divljih borovnica na razinu *Bifidubacteum* vrsta u stolici ispitanika (Vendrame i sur., 2011; Guglielmetti i sur., 2013). Konzumacija soka od divljih borovnica kroz šest tjedana je rezultirala značajnim porastom *Bifidobacterium spp* (Vendrame i sur., 2011), a kvantifikacijom *Bifidobacterium* vrsta zamijećen je značajan porast *Bifidobacterium longum* podvrste *Infantis* (Guglielmetti i sur., 2013). Ova bifidobaterijska skupina je pokazala imunomodulatornu sposobnost te smanjenje gastrointestinalnih problema (Guglielmetti i sur., 2013). Dok je bifidogeni utjecaj potvrđen dvotjednom konzumacijom jabuka, šezdesetodnevna konzumacije soka od banane nije pokazala statistički značajan utjecaj (Sheflin i sur., 2017).

S obzirom na mali broj istraživanja, nije moguće zaključiti u kojoj mjeri voće i povrće utječe na crijevnu mikrobiotu (Sheflin i sur., 2017).

2.2.2.3. Mesni proizvodi

Dosadašnjim observacijskim i eksperimentalnim istraživanjima usporedbe prehrane pretežno biljnog porijekla s prehranom baziranom na životinjskim izvorima, pokazala se razlika u crijevnoj mikrobioti i metabolitima. Međutim, utjecaj prehrane bogate animalnim proteinima na crijevnu mikrobiotu nije još dovoljno istražen (Sheflin, 2017). Jedno istraživanje je pokušalo povezati unos crvenog mesa sa crijevnom mikrobiotom i pojavnošću ateroskleroze, preko metabolizma L-karnitina. Rezultati su pokazali neznatnu razliku u koncentraciji metabolita TMAO (*engl.* trimethylamine N-oxide) između vegana i omnivora pa bi se moglo zaključiti da je crijevna mikrobiota moguće povezana s konzumiranjem crvenog mesa i povećanim rizikom kardiovaskularnih oboljenja, no potrebna su daljnja istraživanja (Koeth i sur., 2013).

2.2.2.4. Crno vino i kava

Prednosti umjerene konzumacije crnog vina uglavnom se pripisuju kompleksnom flavonoidnom sastavu (Etxeberriai sur., 2013). Kao i polifenoli iz drugih izvora hrane, polifenoli vina su korišteni za prikaz selektivne modulacije crijevne mikrobiote. Svakodnevna umjerena konzumacija crvenog vina u periodu od 4 tjedna je rezultirala značajnim porastom *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Eggerthella lenta*, te koljena *Fusobacteria* što upućuje na moguće prebiotičke prednosti povezane s uključivanjem polifenola crvenog vina u prehranu (Queipo-Ortuño i sur., 2013).

Zbog visokog sadržaja (poli)fenolnih spojeva, kava kao jedan od najpopularnijih pića, značajna je za istraživanje sastava crijevne mikrobiote. *In vitro* istraživanjima se pokazao stimulativan utjecaj kave na *Bifidobacterium* baktetrije (Raimondi i sur., 2015; Mills i sur., 2015), a mjerenjem metaboličkih produkata razgradnje klorogene kiseline (engl. Chlorogenic acid - CGA) u uzorku stolice pokazan je utjecaj na sastav mikrobiote (Ludwig i sur., 2013).

2.2.2.5. Stupanj uhranjenosti i crijevna mikrobiota

S obzirom na dosadašnja istraživanja smatra se da stupanj uhranjenosti pojedinca ima značajan učinak na sastav njegove crijevne mikrobiote (Pflughoeft i Versalovic, 2012). Dok se pretilost povezuje s promjenom u omjeru bakterijskih koljena normalno prisutnih u crijevnoj mikrobioti i smanjenom bakterijskom raznolikošću (Turnbaugh i sur., 2009), kod pothranjenih te ispitanika s adekvatnom tjelesnom masom zamijećena je veća raznolikost crijevne mikrobiote u odnosu na pretilu populaciju (Saber i sur., 2017). Istraživanja koja su provedena na pretilim životinjama i ljudima pokazala su povećanje omjera gram pozitivnih *Firmicutes* bakterija u odnosu na gram negativne *Bacteroidetes* upućujući na tzv. „obrazac pretilost“. Povećanjem omjera *Firmicutes/Bacteroidetes* povećana je sposobnost crijevne mikrobiote da stvara energiju iz složenih ugljikohidrata. Dostupni rezultati istraživanja sugeriraju da su razlike u crijevnoj mikrobioti koje su vjerojatno povezane s pretilošću rezultat korištenja visoko kalorijske, visoko masne te visoko ugljikohidratne zapadnjačke prehrane (Bell i sur., 2015).

Iako postoji mnogo istraživanja na pretilim ispitanicima, crijevna mikrobiota adekvatno uhranjenih te pothranjenih ispitanika nije dovoljno ispitana. Uz to neujednačenost rezultata po pitanju omjera *Firmicutes/Bacteroidetes* u pretilih osoba, ukazuju na nužnost daljnjih istraživanja koja će omogućiti razumijevanje poveznice prehrane, stila života i stupnja uhranjenosti sa sastavom crijevne mikrobiote.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, u vremenskom periodu od siječnja do travnja 2018. godine kao dio projekta MicroEquilibrium – Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva, financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

Regrutacija ispitanika je provedena putem društvenih mreža, javnih letaka, oglasa na web stranici projekta MicroEquilibrium te putem osobnih poznanstava istraživača uključenih u projekt.

Prilikom regrutacije ispitanika uključujući kriteriji su bili:

- Indeks tjelesne mase (ITM) ($<18,5 \text{ kgm}^{-2}$; $20\text{-}22 \text{ kgm}^{-2}$; $>27 \text{ kgm}^{-2}$);
- oba spola;
- dob: od 18 do 35 godina;
- zdravi ispitanici (bez poznatih kroničnih oboljenja).

Isključujući kriterij je bio:

- uzimanje antibiotika tijekom posljednja tri mjeseca prije uključivanja.

S obzirom na zadane kriterije, od ukupno 136 prijavljenih ispitanika njih 56 bilo je prikladno za sudjelovanje, od čega se njih 40 odazvalo na mjerenje te je ispunilo sve potrebne upitnike. Ispitanici su u svrhu istraživanja podijeljeni u tri kategorije ovisno o indeksu tjelesne mase; 13 pothranjenih ispitanika, 10 ispitanika adekvatne tjelesne mase te 17 ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću. Istraživanjem su obuhvaćena oba spola od čega je 20 muškaraca i jednako toliko žena.

Uključivanje ispitanika u istraživanje je bilo na dragovoljnoj osnovi. Svaki ispitanik prije uključivanja je detaljno upućen u protokol i ciljeve istraživanja te je potpisao informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

Istraživanje cijelog znanstvenog projekta je provedeno u suglasju s preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima te sa Zakonom o potvrđivanju Konvencije o zaštiti

ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine (Hrvatski Sabor, 2003), odnosno dijelova koji se odnose na istraživanja na ljudima, kao i na zaštitu privatnosti i anonimnosti. Istraživanje je prije početka provedbe Projekta odobreno pozitivnim rješenjima (suglasnostima za provođenje istraživanja) Etičkog povjerenstva Dječje bolnice Srebrnjak te Etičkog povjerenstva Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva Instituta za antropologiju.

3.2. METODE

Metode koje su se koristile u istraživanju bile su: antropometrijske, dijetetičke, biokemijske, genomičke te statističke metode.

3.2.1. Prikupljanje općih i biokemijskih parametara

Tijekom probira ispitanika Općim upitnikom o prehranbenim navikama prikupljali su se podaci o prehranbenim i životnim navikama te zdravstvenom stanju ispitanika (pitanja su podijeljena na opća – 15; pitanja o zdravstvenom stanju – 12, te pitanja o prehranbenim navikama – 33). Upitnikom o tjelesnoj aktivnosti Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) - *Global Physical Activity Questionnaire* (GPAQ) (WHO, 2006) dobiven je uvid u učestalost i jačinu tjelesne aktivnost ispitanika.

Od svakog ispitanika je prikupljen uzorak stolice, izmjeren krvi tlak uređajem *OMRON M6 Comfort* (slika 4), te su određene glukoza i kolesterol iz uzoraka kapilarne krvi uređajem *Accutrend® Plus System* (*Roche Diagnostic USA*) (slika 5). Također, ispitanici su procjenjivali konzistenciju vlastite stolice pomoću Bristolske ljestvice (engl. *Bristol stool scale*). Skala prikazuje sedam tipova stolice koji se razlikuju u veličini i konzistenciji što ukazuje na stanje probave (Lewis i Heaton, 1997).



Slika 4. Tlakomjer *OMRON M6 Comfort*.



Slika 5. Uređaj za mjerenje glukoze i kolesterola iz kapilarne krvi *Accutrend® Plus System* (Roche Diagnostic USA).

3.2.2. Dijetetička metoda – trodnevni dnevnik prehrane

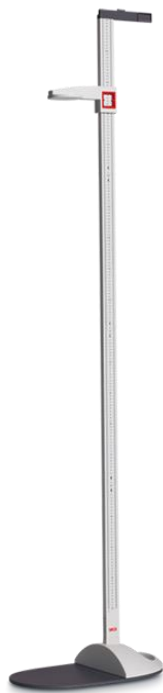
U ovom istraživanju korištena dijetetička metoda je bila trodnevni dnevnik prehrane kojim su prikupljeni i analizirani podaci o unosu energije, makronutrijenata i mikronutrijenata te je omogućen uvid u obrazac prehrane. Ispitanici su vodili trodnevni dnevnik prehrane tri uzastopna dana neposredno prije provođenja antropometrijskih mjerenja te davanja uzoraka stolice. Detaljne informacije o vođenju dnevnika s oglednim primjerkom te obrascima za vođenje dnevnika ispitanici su dobili prilikom uključivanja u istraživanje. Količinu konzumirane hrane i pića odrađivali su vaganjem ili su je procjenjivali pomoću kuhinjskog posuda (npr. žlica, čajna žličica, čaša, šalica, zdjelica, tanjur). Za kupovne namirnice koristili su količine navedene na deklaraciji (te su prilagali deklaracije dnevniku). Osim hrane i pića u dnevnik su upisivani svi ostali pripravci i dodaci prehrani te njihova konzumna količina. Za složena jela ispitanici su navodili recept ukoliko je bio poznat, no u slučaju izostanka istog kao, zamjena prilikom obrade dnevnika korištene su standardne recepture (Coolinarika, 2018).

Svi prikupljeni dnevnik prehrane obrađivani su pomoću hrvatskih nacionalnih prehrambenih tablica (Kaić-Rak, 1990) koje su zbog manjkavosti namirnica nadopunjavane podacima s deklaracija konzumiranih prehrambenih proizvoda.

3.2.2. Antropometrijske metode

Sastav i veličina tijela ispitanika su utvrđeni pomoću antropometrijskih metoda. Antropometrijske metode korištene u ovom istraživanju uključivale su: mjerenje tjelesne visine, tjelesne mase, opsege struka, bokova, te sastav tijela (udio masnog i mišićnog tkiva, te razina visceralnog tkiva).

Pomoću visinomjera Seca 217 (Seca Ltd.) (slika 6) mjerena je visina tijela s preciznošću od 0,1 cm. Mjerenje je provedeno bez obuće, u uspravnom, opuštenom stavu pri čemu su tjeme, lopatice, stražnjica i pete dodirivale mjernu skalu, a glava je bila u Frankfurt horizontalnom položaju (zamišljena linija donjeg ruba lijeve orbite, tragus heliksa i lijevog uha se nalazila u vodoravnom položaju u odnosu na podlogu) (Lee i Nieman., 2013).



Slika 6. Visinomjer *Seca 217* (Seca Ltd.).

Tjelesna masa mjerena je u laganoj odjeći i bez obuće pomoću *OMRON BF-511* analizatora sastava tijela (slika 7) s preciznošću 0,1 kg. *OMRON BF-511* analizator radi na principu bioelektrične impendancije (BIA) što znači da postupak mjerenja podrazumijeva propuštanje za ispitanika ne osjetljive i ne štetne struje jakosti najviše do 800 mA (Štalić i sur., 2016) pa su osim tjelesne mase prikupljeni podaci o postotku mišićnog i masnog tkiva i razina visceralnog tkiva.



Slika 7. Analizator sastava tijela *OMRON BF-511*.

Savitljivom, ne elastičnom mjernom vrpcom mjereni su opsezi struka, bokova s preciznošću od 0,1 cm te je naknadnom računanjem dobiven omjer opsega struka i bokova (WHR) te odnos opsega struka i tjelesne visine (WHtR).

3.2.3. Genomičke metode

Iz uzoraka stolice prikupljenih na dan provođenja antropometrijskih mjerenja izolirana je deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic acid* - DNA) te je njenim sekvenciranjem određen sastav crijevne mikrobiote ispitanika.

3.2.3.1. Izolacija i mjerenje koncentracije DNA

Za izolaciju je korišten QIAamp® PowerFecal® DNA set kemikalija (kit) prema protokolu Quick-Start. Uzorci stolice, prethodno čuvani u zamrzivaču na -80°C, otopljeni su na sobnoj temperaturi i homogenizirani prije daljnjih koraka obrade uzorka. Za izolaciju je korišteno 0,25 g uzorka stolice sukladno uputama proizvođača kit-a za izolaciju DNA.

Za određivanje koncentracije DNA korišten je uređaj *BioSpec Nano-drop* spektrofotometar (Shimadzu Biotech) koji je prikazan na slici 8.



Slika 8. *BioSpec Nano-drop* spektrofotometar (Shimadzu Biotech).

3.2.3.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena

Sekvenciranje DNA obavljeno je u Molecular Research Lab (MRDNA LAB), Teksas, SAD. Korištena je metoda sekvenciranja sparenih krajeva (pair-end sequencing) pomoću Illumina MiSeq uređaja s MiSeq v3 kitom za sekvenciranje. Korištene su početnice 341F/806R za umnažanje V3 i V4 regija gena koji kodira za 16S rRNA korištenjem lančane reakcije polimeraze (PCR) u 30 ciklusa. Nakon umnažanja fragmenta gena PCR produkti su provjereni na 2%-om agaroznom gelu te su pročišćeni korištenjem kalibriranih Ampure XP kuglica. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za izradu DNA knjižnica upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola te zatim sekvencirani Illumina MiSeq platformom.

3.2.3.3. Obrada podataka sekvenciranja i analiza mikrobiote

Sirovi podaci sekvenciranja fragmenta gena 16S rRNA preuzeti su s Illumina Basespace (<https://basespace.illumina.com>) platforme u obliku Fastq datoteka. Preuzete su dvije fastq datoteke pri čemu jedna odgovara očitanim sljedovima nukleotida u prednjem (engl. forward) načinu čitanja, dok druga u stražnjem načinu čitanja slijeda (engl. reverse). Nakon preuzimanja dokumenti su učitani u programski paket QIIME 2 (<https://qiime2.org/>) te su prednji i stražnji slijed nukleotida spojeni u cjelovitu sekvencu. Svi uzorci se nakon spajanja

nalaze u jednom dokumentu te je potrebno svaki slijed dodijeliti odgovarajućem uzorku na osnovu očitanoj slijeda nukleotida koji se nalazi na početku svake sekvence – tzv. barkoda. Sekvence kojima prvih 8 nukleotida nije u potpunosti odgovaralo jednom od korištenih barkodova su odbačene iz daljnjih analiza. Sekvence su prošle kontrolu kvalitete korištenjem DADA 2 programskog paketa koji je optimiziran za ispravljanje grešaka sekvenciranja Illumina platformom. Slijedovi svakog uzorka su klasterirani u operacijske taksonomske jedinice (OTU) sa minimalnom pokrivenošću od 97 % i minimalnom identičnošću od 97 %, što odgovara definiciji OTU-a na taksonomskom nivou vrste. Reprezentativni slijed svakog klastera je poravnat sa Greengenes 16S rRNA taksonomskom bazom korištenjem mafft algoritma čime je određena taksonomska identifikacija svakog OTU-a. Filogenetsko stablo je izrađeno korištenjem aproksimirane metode najveće vjerojatnosti (engl. *approximately-maximum-likelihood*) implementiranom u FastTree programu. Za određivanje različitosti između svakog para uzoraka (bakterijskih zajednica) korištena je UniFrac metrika. Mala UniFrac udaljenost karakterizira uzorke koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica i koje su evolucijski bliske. U upotrebi su dva tipa UniFrac metrika - težinska i netežinska. Težinska UniFrac metrika pri izračunu udaljenosti zajednica uzima u obzir prisutnost i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice, dok netežinska uzima u obzir samo prisutnost. Za određivanje razlike u zastupljenosti pojedinih OTU-ova između uzoraka ili grupa uzoraka korištena je ANCOM metoda koja je razvijena kako bi uzela u obzir kompozicijska ograničenja koja predstavlja mikrobiota.

3.2.4. Statističke metode

Analiza i obrada podataka je provedena uz pomoć programa MS Excel (Microsoft, Seattle, WA, USA) te statističkog programa SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Za opis karakteristika ispitanika primijenjene su standardne metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, medijan, standardna devijacija, standardna greška). Normalnost distribucije ispitana je Shapiro-Wilk testom. Razlike u karakteristikama između skupina uspoređivane su nezavisnim Studentovim ANOVA testom za parametrijske, a Kruskal-Wallis (ANOVA testom) za neparametrijske podatke. Svi dobiveni rezultati prikazuju se kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija/standardna greška.

Za sve sprovedene testove razina značajnosti utvrđena je na razini $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu su istraživane prehrambene navike mlađe, naizgled zdrave, populacije različitih stupnjeva uhranjenosti te su ispitivane razlike u prehrani i njihov utjecaj na crijevnu mikrobiotu. Tijekom istraživanja su prikupljeni opći, antropometrijski, biokemijski i dijetetički podaci te genomički podaci dobiveni sekvencioniranjem DNA iz prikupljenih uzoraka stolice ispitanika.

Rezultati su podijeljeni na 3 dijela s obzirom na područje koje obuhvaćaju i prikazani su u obliku 7 tablica te 24 slike:

1. Opći, antropometrijski i biokemijski podaci prikazani su u tablicama od 2 do 6 te slikom 4.
2. Dijetetički podaci ispitanika, koji prikazuju podatke o prehrambenim navikama i unosu makronutrijenata, prikupljeni trodnevnim dnevnikom prehrane, prikazani su slikama od 9 do 20 i tablicama 7 i 8.
3. Genomički podaci dobiveni sekvencioniranjem DNA iz prikupljenih uzoraka stolice prikazani su slikama od 21 do 27.

4.1. OPĆI, ANTROPOMETRIJSKI I BIOKEMIJSKI PODACI

U istraživanju je sudjelovalo 40 ispitanika oba spola u dobi od 18 do 35 godina. Prosječna dob svih ispitanika je bila $25,75 \pm 4,25$ godina te nije bilo razlike u dobi promatrano prema stupnju uhranjenosti (tablica 2). Od ukupnog broja ispitanika s obzirom na ITM, u pothranjenoj skupini je bilo 13 (32,5 %) ispitanika, u skupini adekvatno uhranjenih je bilo 10 (25 %) ispitanika, a njih 17 (42,5 %) je bilo u pretiloj skupini. S obzirom na spol, u istraživanju je sudjelovalo po 20 ispitanika oba spola. Veći broj žena bio je u skupinama pothranjenih (64,5 %) i adekvatno uhranjenih (70,0 %) dok je u skupini pretilih bilo manje žena (29,4 %) u odnosu na muškarce. Analizom antropometrijskih parametara utvrđena je statistički značajna razlika u svim promatranim parametrima izuzev tjelesne visine, što se i očekivalo s obzirom na raspodjelu ispitanika prema stupnju uhranjenosti što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Usporedba dobi, spola te antropometrijskih parametara između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti (n=40).

Parametar	Ispitanici (n=40)	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)	<i>p</i> *
	<i>x</i> ± SE	<i>x</i> ± SE	<i>x</i> ± SE	<i>x</i> ± SE	
Dob (godine)	25,75 ± 4,25	24,92 ± 2,90	24,00 ± 2,36	27,41 ± 5,40	0,131
Spol (% žena)	50,00	64,5	70,0	29,4	0,077
Tjelesna visina (cm)	176,88 ± 11,72	184,31 ± 10,46	171,67 ± 9,65	181,91 ± 12,29	0,053
Opseg struka (cm)	80,90 ± 16,16	67,88 ± 6,8	72,28 ± 7,17	95,92 ± 12,21	<0,001
Opseg bokova (cm)	101,57 ± 13,00	88,55 ± 6,4	96,15 ± 5,91	114,71 ± 4,71	<0,001
WHR[#]	0,79 ± 0,09	0,77 ± 0,08	0,75 ± 0,08	0,84 ± 0,09	0,032
WHtR[°]	0,46 ± 0,08	0,39 ± 0,03	0,42 ± 0,02	0,53 ± 0,06	<0,001

* *p* < 0,05; SE – standardna greška; [#]WHR - omjer struka i bokova; [°]WHtR - omjer opsega struka i tjelesne visine

Sastav tijela mjereno je uz pomoć *OMRON* analizatora koji radi na principu bioelektrične impedancije (tablica 3). Očekivana statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između promatranih skupina primjećena je za sve ispitivane parametre sastava tijela osim u postotku mišićnog tkiva ($p = 0,198$), što može biti posljedica različite distribucije muškaraca i žena po skupinama. Veća zastupljenost žena je u skupinama pothranjenih (64,5 %) i adekvatno uhranjenih (70,0 %), naspram broja u pretiloj skupini (29,4 %). Literaturni podatak pokazuje da je prosječni udio mišića u žena 28 %, a muškaraca 37 % (Omron, 2007) pa bi stoga manji broj žena u pretiloj populaciji mogao objasniti izostanak značajne razlike između skupina.

Tablica 3. Prikaz rezultata dobivenih analizatorom sastava tijela (*OMRON*).

Parametri	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)	<i>P</i> *
	$\bar{x} \pm SE$	$\bar{x} \pm SE$	$\bar{x} \pm SE$	
Tjelesna masa (kg)	55,15 ± 7,86	64,73 ± 7,84	102,78 ± 15,54	<0,001
Masno tkivo (%)	16,43 ± 6,33	25,52 ± 6,91	33,54 ± 7,64	<0,001
Mišićno tkivo (%)	35,18 ± 8,02	33,49 ± 5,76	31,09 ± 4,43	0,198
Razina visceralnog tkiva	1,62 ± 0,77	3,70 ± 0,67	10,29 ± 3,5	<0,001
ITM (kgm⁻²)	18,07 ± 1,02	21,91 ± 0,94	30,98 ± 2,76	<0,001

* $p < 0,05$; SE – standardna greška

Povećan ITM povezuje se s mnogobrojnim kroničnim bolestima, posebice kardiovaskularnim oboljenjima, dijabetesom te osteoartritisom (Ng i sur., 2015), stoga su u ovom istraživanju mjereni određeni biokemijski parametri (krvni tlak sistolički i dijastolički te glukoza i kolesterol iz kapilarne krvi) u ispitanika, kako bi se utvrdili rizični čimbenici u naizgled zdrave skupine ispitanika. Sistolički krvni tlak bio je viši u pretiloj skupini u odnosu na pothranjenu ($p < 0,001$) i adekvatno uhranjenu skupinu ($p < 0,030$). To je jedina statistički značajna razlika između skupina (tablica 4). Ostali biokemijski parametri bili su u prihvatljivim rasponima te se nisu statistički značajno razlikovali između skupina, što je očekivano s obzirom da se ispitala mlađa, zdrava populacijska skupina. Radi uvida u stanje probave ispitivana je učestalost stolice i pojavnost opstipacije te je utvrđeno da 95,5 % ispitanika ne pati od opstipacije, a 50 % ispitanika ima svakodnevno, do tri puta stolicu (tablica 5). S obzirom na Bristolsku ljestvicu stolice,

kojom se procjenjivao tip, odnosno konzistencija stolice, nije zamijećena statistički značajna razlika ($p=0,278$) u konzistenciji stolice između ispitivanih skupina.

Tablica 4. Usporedba biokemijskih parametara između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti (n=40).

Parametar	Ispitanici (n=40)	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)	p^*
	$\bar{x} \pm SE$	$\bar{x} \pm SE$	$\bar{x} \pm SE$	$\bar{x} \pm SE$	
Krvni tlak sistolički (mmHg)	123,53 \pm 15,53	113,69 \pm 12,61	119,20 \pm 11,25	133,59 \pm 14,12	0,001
Krvni tlak dijastolički (mmHg)	78,23 \pm 8,68	76,23 \pm 7,72	75,80 \pm 9,35	81,18 \pm 8,57	0,561
GUK[#] (mmol/L)	4,42 \pm 0,89	4,28 \pm 0,63	4,18 \pm 0,80	4,67 \pm 1,07	0,401
Kolesterol (mmolL⁻¹)	4,78 \pm 0,83	4,81 \pm 1,00	4,68 \pm 0,87	4,80 \pm 0,70	0,335

* $p < 0,05$; SE – standardna greška; [#] glukoza u krvi (kapilarne)

Tablica 5. Učestalosti stolice između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti.

Parametar	Ispitanici (n=40)	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)
Učestalost stolice	%	n	%	n
Svaki drugi dan	15,0	4	30,8	2
Svakodnevno	32,5	4	30,8	4
Svakodnevno, (2 do 3)	50,0	5	38,5	4
Svakodnevno, (> 3)	2,5	0	0,0	0

Neke od životnih navika čiji utjecaj se povezuje s promjenama u sastavu crijevne mikrobiote su konzumacija kave, alkohola, posebice crnog vina (Graf i sur., 2015), pušenje te tjelesna aktivnost (Conlon i Bird, 2015). Jedina statistički značajna razlika ($p=0,040$) utvrđena u ovom istraživanju s obzirom na navedene parametre je konzumacija alkohola između skupina. Dok gotovo svi ispitanici pretili (100,0 %) i pothranjene skupine (92,3 %) konzumiraju alkohol, tek 70,0 % ispitanika adekvatno uhranjene skupine se izjasnilo da konzumiraju alkohol (tablica 6).

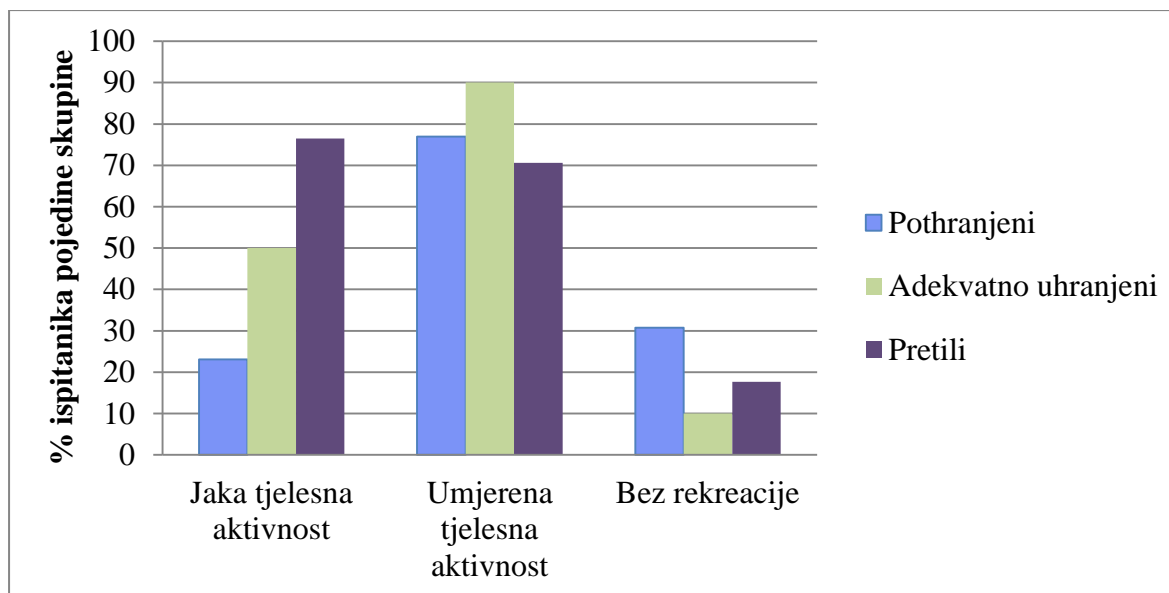
Tablica 6. Usporedba konzumacije kave, alkohola i tjelesne aktivnosti između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti

Parametar	Ispitanici (n=40)		Pothranjeni (n=13)		Adekvatno uhranjeni (n=10)		Pretili (n=17)		p^*
Konzumacija kave	%	n	%	n	%	n	%		
DA	67,5	9	69,2	4	40,0	14	82,4		0,077
NE	32,5	4	30,8	6	60,0	3	17,7		
Konzumacija alkohola	%	n	%	n	%	n	%		
DA	90	12	92,3	7	70,0	17	100,0		0,040
NE	10	1	7,7	3	30,0	0	0,0		
Tjelesna aktivnost	%	n	%	n	%	n	%		
DA	67,5	8	61,5	7	70,0	12	70,6		0,539
NE	32,5	5	38,5	3	30,0	5	29,4		

* $p < 0,05$

U ispitivanim skupinama zabilježeno je podjednako bavljenje tjelesnom aktivnošću (pothranjeni 61,5 %, adekvatno uhranjene 70,0 %, pretili 70,6 %), uz to jakom tjelesnom aktivnošću najviše se bave pretili (76,5 %), a minimalno hodanje od 15 min dnevno prakticiraju svi ispitanici (slika 9). Ovakav rezultat nije očekivan jer tjelesna neaktivnost može biti jedan od rizičnih čimbenika za pojavu pretilosti, ali i drugih kroničnih oboljenja (Warburton i sur., 2006) no treba uzeti u obzir dob populacije. Mlađe generacije podložnije su društvenim trendovima gdje se dosta pažnje usmjerava na vanjski izgled i zdravlje te se generalno prate isti obrasci ponašanja. Veći interes pretila skupine za jaču tjelesnu

aktivnost može se povezati s većim postotkom muškaraca u toj skupini (70,6%) čija motivacija za tjelesnu aktivnost počiva u većoj potrebi za kompeticijom, izazovom te isticanjem vlastite snage (Molanorouzi i sur., 2015). Uz to tijekom regrutacije ispitanika birali su se ispitanici koji su se tijekom života bavili tjelesnom aktivnošću.

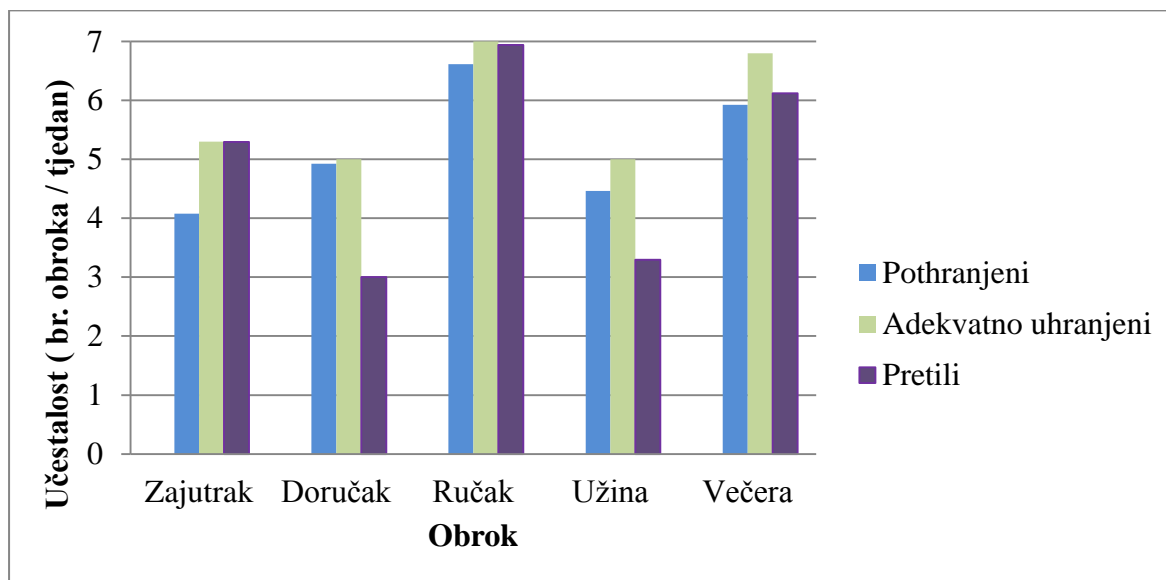


Slika 9. Prikaz stupnja tjelesne aktivnosti po skupinama s obzirom na ITM.

4.2. DIJETETIČKI PODACI ISPITANIKA

Unutar ovog poglavlja sažeto su prikazane prehrambene navike ispitanika podijeljenih u skupine s obzirom na stupanj uhranjenosti. Tijekom analize prehrambenih navika uzeto je u obzir: učestalost konzumacije obroka, prosječan energetske unos, unos makronutrijenata i vlakana te zastupljenost određenih skupina namirnica u prehrani.

Ispitivanjem učestalosti konzumacije pojedinih obroka tijekom jednog prosječnog tjedna nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti. Na slici 10. može se primijetiti da su glavni obroci u danu za sve ispitanike ručak (6,94 puta/tjedan pretili, 7,00 puta/tjedan adekvatno uhranjeni, 6,62 puta/tjedan pothranjeni) i večera (6,12 puta/tjedan pretili, 6,80 puta/tjedan adekvatno uhranjeni, 5,92 puta/tjedan pothranjeni). Pretili ispitanici rjeđe konzumiraju međuobroke (3 puta tjedno) u odnosu na adekvatno uhranjenu te pothranjenu skupinu (4-5 puta tjedno). Iako neka znanstvena istraživanja potvrđuju pretpostavku kako češća konzumacija manjih obroka utječe na gubitak i bolju regulaciju tjelesne mase, sve se više ističe važnost dosljednosti broja obroka kroz tjedan, jer varijacije u broju obroka mogu imati negativne metaboličke učinke (Schoenfeld i sur., 2015).



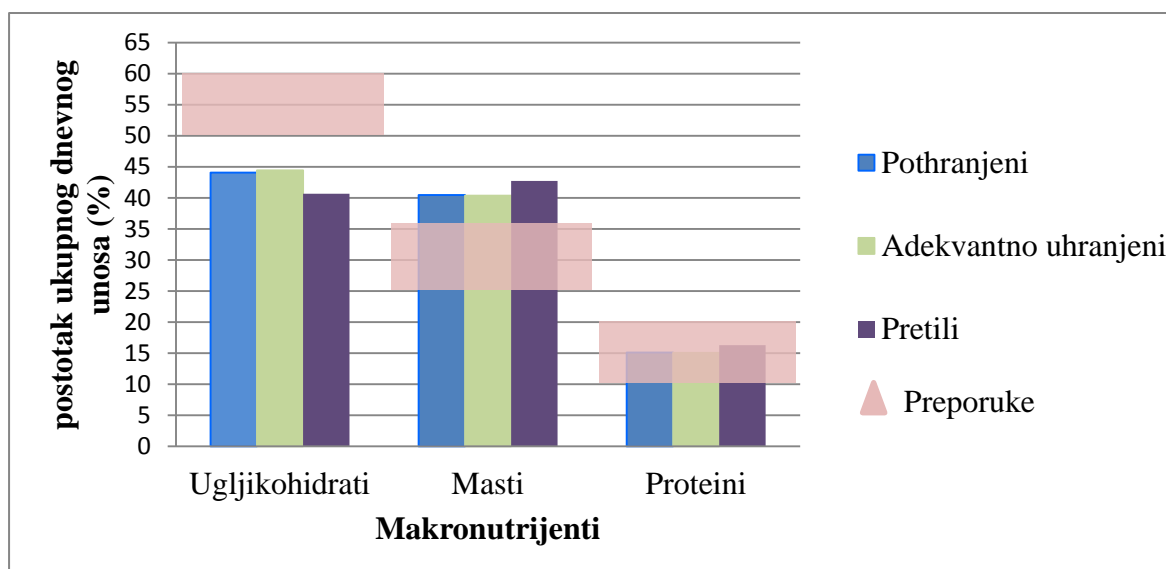
Slika 10. Usporedba učestalosti konzumiranja pojedinih obroka između ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti (n=40).

Neposredno prije dolaska na antropometrijsko mjerenje ispitanici su zamoljeni da vode trodnevni dnevnik prehrane radi uvida u njihove prehrambene navike, unosa energije, makronutrijenata i vlakana. Dobiveni rezultati su obrađeni, analizirani kao takvi, ali i naknadno korišteni tijekom analize crijevne mikrobiote kako bi se ustvrdila poveznica prehrane i sastava crijevne mikrobiote. Iz trodnevnog dnevnika prehrane izračunati je prosječan unos energije, makronutrijenata i vlakana (tablica 7) te prosječan unos pojedinih skupina namirnica s obzirom na stupanj uhranjenosti (tablica 8). U tablici 7 vidljivo je da nema statistički značajne razlike u prosječnom dnevnom unosu energije, ugljikohidrata, masti, proteina i vlakana između ispitivanih skupina. Sličan unos navedenih parametara može biti posljedica sličnih prehrambenih navika, naime većina ispitanika su studenti koji imaju specifičan obrazac prehrane (jedu u studentskim restoranima, jedu u žurbi i slično).

Tablica 7. Prikaz unosa energije i makronutrijenata s obzirom na stupanj uhranjenosti.

Parametar	Ukupni ispitanici (n=40)	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)	<i>p</i>*
Energija (kcal/dan)	2450,67	2324,15	2511,87	2511,41	0,740
Ugljikohidrati (g/dan)	262,96	259,56	278,99	256,14	0,829
Masti (g/dan)	112,16	102,77	111,00	120,03	0,555
Proteini (g/dan)	95,71	87,32	96,61	101,59	0,509
Vlakna (g/dan)	23,79	26,86	20,28	23,50	0,471

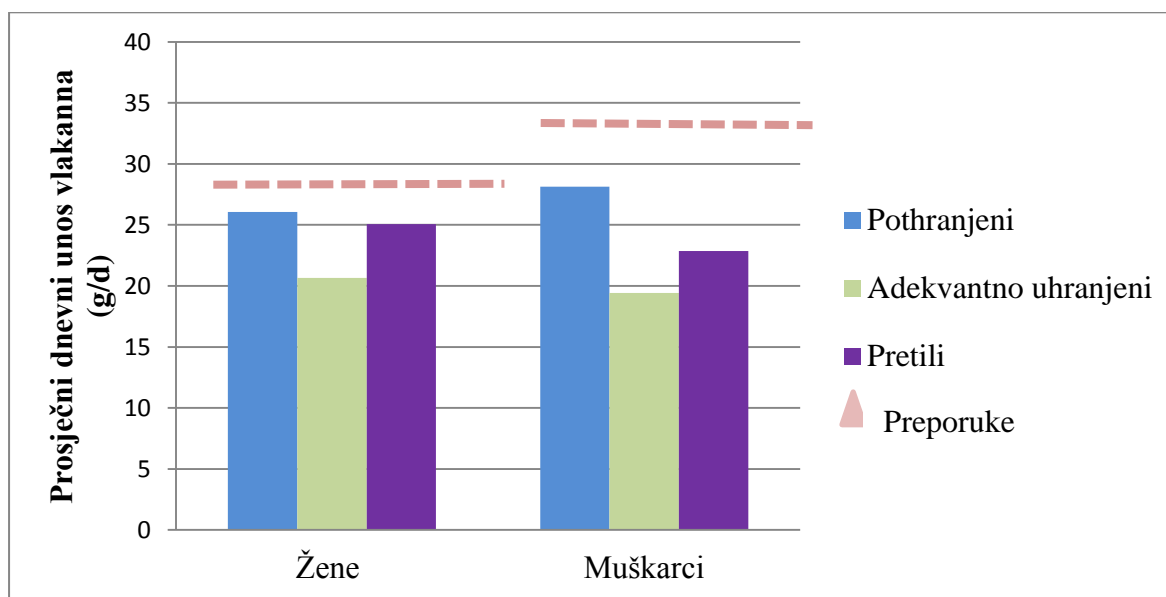
* $p < 0,05$



Slika 11. Grafički prikaz unosa makronutrijenata u ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti u odnosu na hrvatske preporuke (*ružičasto=hrvatske prehrambene preporuke; ugljikohidrati 50-60% dnevnog energetskeg unosa, masti 25-35% dnevnog energetskeg unosa, proteini 10-20% dnevnog energetskeg unosa (Odluka, 2015)).

Usporedbom prosječnog dnevnog unosa makronutrijenata procijenjenog iz trodnevnog dnevnika prehrane, iskazanih kao postotak cjelodnevnog energetskeg unosa s hrvatskim preporukama (Odluka, 2015) utvrđeno je kako ispitanici svih skupina (raspodijeljeni prema stupnju uhranjenosti) unose nedovoljno ugljikohidrata, višak masti te adekvatnu količinu proteina u odnosu na preporuke što je prikazano na slici 11. Također, prosječan dnevni unos vlakana ispitanika unutar svih ispitivanih skupina manji je od 25 g/dan (tablica 7), što je postavljena referentna vrijednost za normalno funkcioniranje crijeva u odraslih osoba prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA, 2010). Prema najnovijim USDA (engl. *United States Department of Agriculture*) smjernicama (2015) različit je preporučeni unos za muškarce (33,6 g/dan) i žene (28 g/dan). Rezultati istraživanja ukazuju da žene (njih čak 85,4 %) zadovoljavaju u većoj mjeri preporuke od muškaraca (70,4 %). Zanimljivo je da preporuke za unos vlakana u najmanjem postotku zadovoljavaju adekvatno uhranjene žene (73,7 %) i muškarci (57,8 %) u odnosu na skupinu pothranjenih (žene: 93,1 %, muškarci: 83,7 %) i pretilih (žene: 89,5 %, muškarci: 68,0 %) ispitanika (slika 12). No ukoliko se u obzir uzima preporuka za unos vlakana u količini od 14 g konzumiranih na 1000 kcal, najviše je zadovoljavaju pothranjeni (82,6 %), zatim adekvatno

uhranjeni (69,3 %) te na kraju pretili (66,9%) ispitanici, što je očekivani rezultat prema ranijim istraživanjima (Kendall i sur., 2010). Povećani unos masti te nedovoljan unos prehrambenih vlakana, neke su od karakteristika zapadnjačke prehrane za koju je utvrđen utjecaj na sastav crijevne mikrobiote (Graf i sur., 2015), a navedeno je zamijećeno kod svih ispitivanih skupina u ovom istraživanju.



Slika 12. Prikaz prosječnog dnevnog unosa vlakana s obzirom na stupanj uhranjenosti te spol (*ružičasto = USDA preporuke za žene između 19-30 godina >28 g/dan, a muškarce između 19-30 godina >33,6 g/dan).

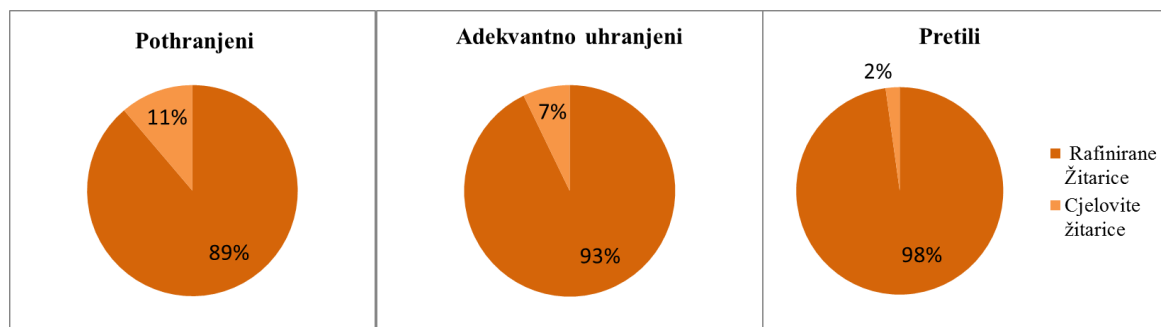
Hrana zabilježena u trodnevnim dnevnicima prehrane tijekom analize je podijeljena u šest osnovnih skupina te je računat njihov prosječan dnevni unos u ispitanika podijeljenih s obzirom na stupanj uhranjenosti (tablica 8). Dobiveni podaci uspoređivani su s hrvatskim Prehrambenim smjernicama za odrasle (2002) kako bi se utvrdile i usporedile prehrambene navike svih triju skupina ispitanika. Između skupina pothranjenih, adekvatno uhranjenih te pretilih ispitanika nije zamijećena statistički značajna razlika u prosječnom unosu skupina: voće i povrće (g/dan), žitarice (g/dan), meso i mesni proizvodi (g/dan), masti i ulja (g/dan) te ukupna tekućina (L/dan). Jedina statistički značajna razlika ($p=0,046$) zamijećena je u prosječnom dnevnom unosu mlijeka i mliječnih proizvoda (mL/dan) između navedenih skupina ispitanika.

Tablica 8. Tablični prikaz prosječnog dnevnog unosa pojedine skupine namirnica i usporedba s preporukama (Hrvatske prehrambene smjernice (2002)).

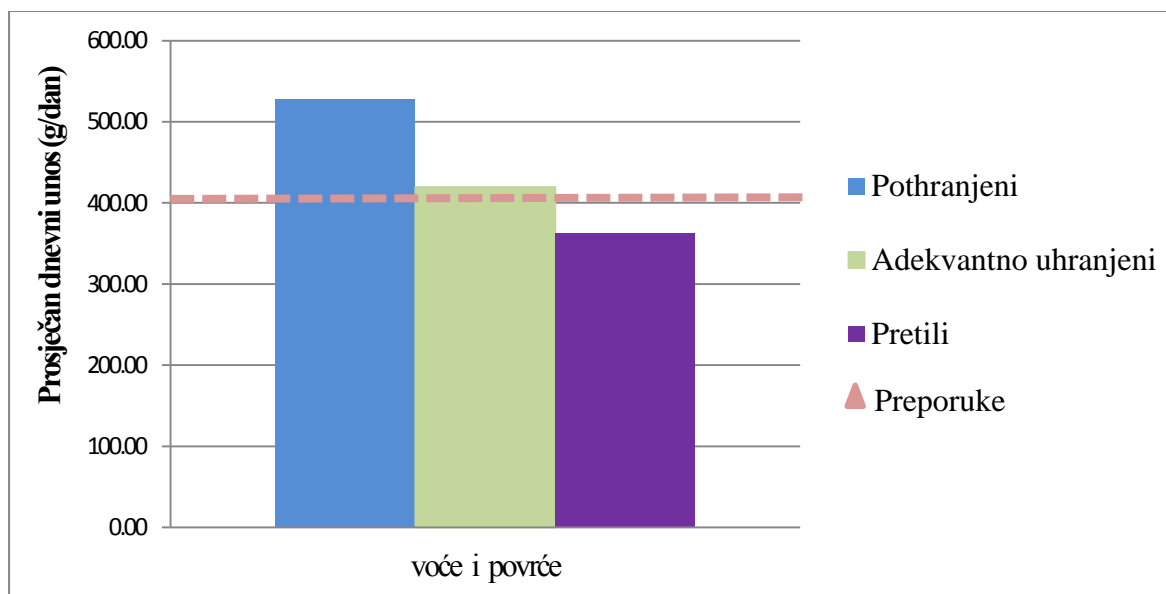
Parametri	Dnevna preporuka	Ukupni ispitanici (n=40)	Pothranjeni (n=13)	Adekvatno uhranjeni (n=10)	Pretili (n=17)	<i>p</i> *
Voće i povrće	> 400 g/dan	436,96	528,30	419,61	362,96	0,114
Žitarice		250,49	213,09	254,44	283,94	0,383
Mlijeko i mliječni proizvodi	barem 500 ml/dan	254,14	175,02	374,75	212,64	0,046
Meso i mesni proizvodi		251,68	194,35	228,62	309,09	0,067
Crveno meso	<68 g/dan	102,45	97,66	78,72	131,32	0,115
Masti i ulja	70-90 g/dan	110,16	104,82	111,00	114,66	0,484
Tekućina	barem 1,5 do 2 L/dan	1077,29	1058,60	1130,69	1042,59	0,867

* $p < 0,05$

Svaka skupina namirnica je karakterističnog kemijskog sastava. U ovom istraživanju posebno su značajne skupine žitarica te voća i povrća jer su glavni izvor prehrambenih vlakana, glavne komponente iz hrane koja utječe na sastav i aktivnost crijevne mikrobiote (Ercolini i Fogliano, 2018). Kako se većina aktivnih tvari nalazi u ljusci i klici, preporučuje se da barem polovica ukupnog unosa žitarica bude podrijetlom od cjelovitih žitarica (Alebić, 2008). Udio cjelovitih žitarica u prehrani ispitanika pokazao se nižim od preporuka (kod pothranjenih tek 11 % od ukupnih žitarica čine cjelovite, a kod adekvatno uhranjenih samo 7 %), a posebice u pretiloj skupini gdje je unos bio tek 2 % od ukupnog unosa žitarica (slika 13). Unos voća i povrća bio je u skladu s preporukama u skupini pothranjenih i adekvatno uhranjenih, no ne i u skupini pretilih (prosječan unos skupine zadovoljava 90,7 % preporuke) (slika 14) što nije u skladu s dobivenim rezultatima ranijih istraživanja prehrambenih navika studentske populacije kod kojih je zamijećen značajan nedostatak unosa voća i povrća (Banožić i sur, 2015.).



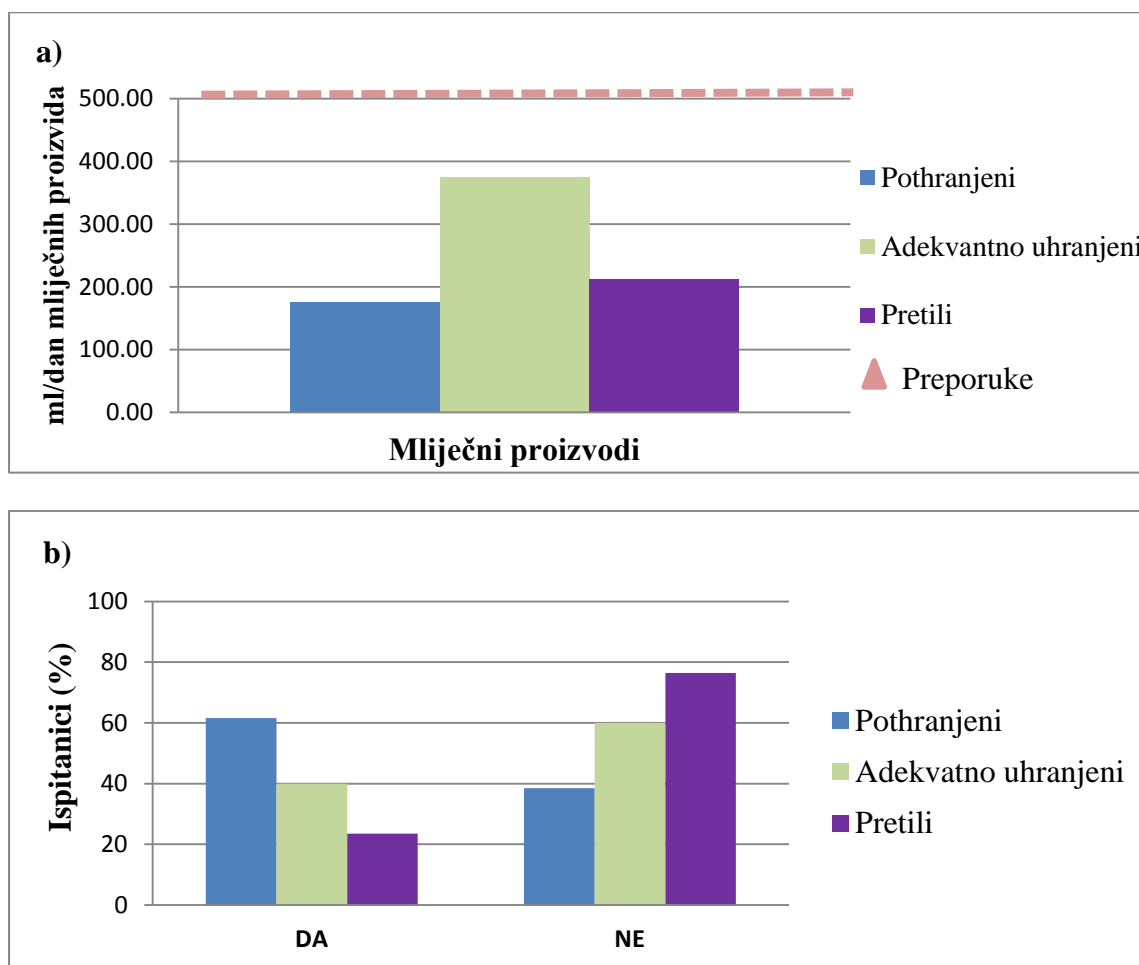
Slika 13. Prikaz udjela cjelovitih žitarica u ukupnom prosječnom dnevnom unosu žitarica.



Slika 14. Grafički prikaz prosječnog dnevnog unosa voća i povrća s obzirom na stupanj uhranjenosti (*ružičasto = preporuka >400 g/dan (Smjernice za odrasle osobe, 2002)).

Iako je zamijećena statistički značajna razlika u konzumaciji mlijeka i mliječnih proizvoda između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti, sve tri skupine ispitanika (pothranjeni unose 35,0 %, adekvatno uhranjeni 75 %, pretili 42,5 % od preporuke) nisu zadovoljile preporuku za minimalan unos od 500 ml/dan (slika 15). Proučavanjem ispitanika pojedinačno zamijećeno je da u cijeloj skupini ispitanika samo njih četvero (10 %) zadovoljava preporučeni unos mlijeka i mliječnih proizvoda, od kojih troje spada u adekvatno uhranjenu skupinu i jedan ispitanik u skupinu pothranjenih ispitanika. Unatoč tome što je najniži unos mliječnih proizvoda u pothranjenoj skupini njih čak 60 % se

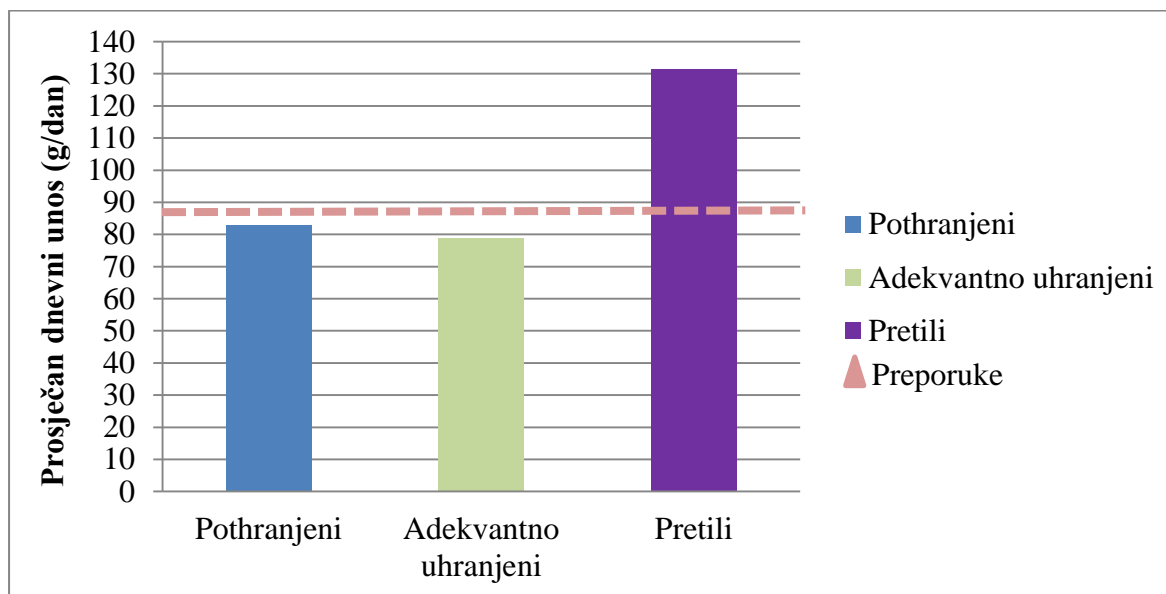
izjasnilo da konzumira mliječne proizvode s dodacima probiotika što je ujedno najveći postotak unutar ispitivanih skupina. Tek 40 % adekvatno uhranjenih te 23,5 % pretilih konzumira mliječne proizvode s dodacima probiotika (slika 15). Neznanje i nepoznavanje probiotičkog djelovanja može biti razlog slabije konzumacije u nekih od ispitivanih skupina (Al-Nabulsi i sur., 2015).



Slika 15. a) prosječan dnevni unos mliječnih proizvoda s obzirom na dob (*ružičasto = preporuka barem 500 ml/dan (Smjernice za odrasle osobe, 2002)), b) prikaz koliko ispitanika (ne)konzumira mliječne namirnice s dodatkom probiotika s obzirom na stupanj uhranjenosti.

U skupini mesa i mesnih proizvoda poseban naglasak dan je na crvenom mesu koje je bogato proteinima te vitaminima B skupine no njegov povećani unos povezuje se s različitim tipovima raka (Bouvardi sur., 2015), dijabetesom, kardiovaskularnim bolestima i

sl. (Rouhani, i sur., 2014) pa se stoga treba pridržavati prehrambenih preporuka. Smjernice za odrasle osobe ne preporučuju unos crvenog mesa veći od 600 g/tjedno, odnosno na dnevnoj bazi ne veći od 86 g. S obzirom na preporuke, sve tri promatrane skupine unose veće količine crvenog mesa na dnevnoj bazi (slika 16), osobito pretila skupina čiji unos je gotovo dvostruko veći od preporuka (131,32 g/dan), što je u skladu s istraživanjem na srednjovječnoj populaciji gdje se viši ITM povezuje s višim unosom crvenog mesa (Shay i sur., 2012).

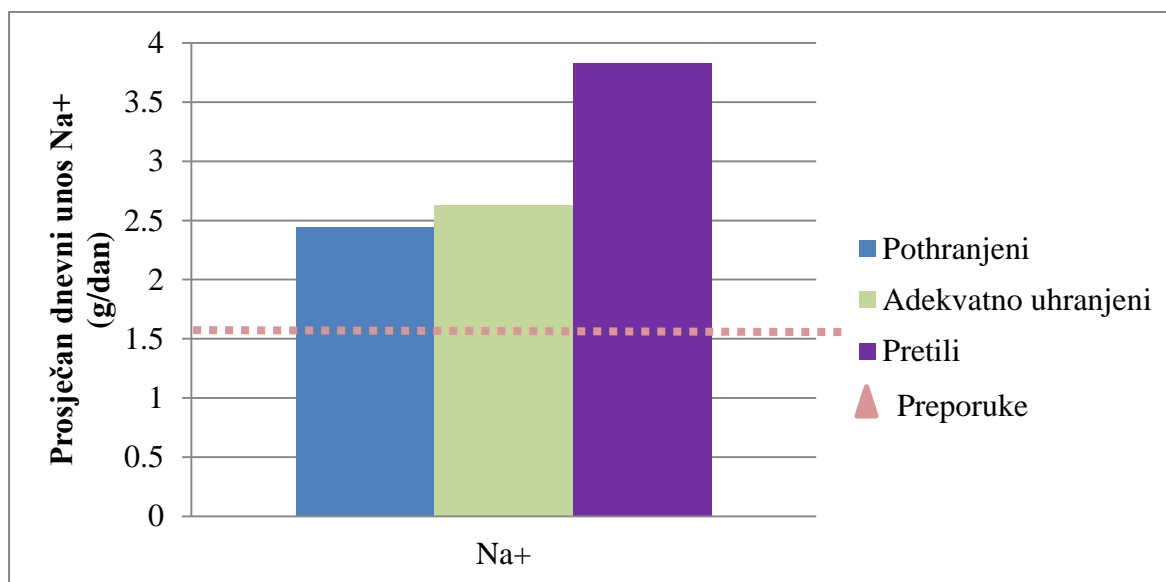


Slika 16. Prikaz prosječnog dnevnog unosa crvenog mesa i mesnih prerađevina po skupinama s obzirom na stupanj uhranjenosti (*ružičasto = preporuka <86 g/dan (Smjernice za odrasle osobe, 2002)).

Uz navedene skupine namirnica bitno je pratiti unos tekućine te komponenti hrane kao što su sol, šećer te zasićene masne kiseline. Voda ima mnogobrojne funkcije u organizmu koje su ključne za održavanje homeostaze, a neke od njih su: sudjelovanje u kemijskim reakcijama bilo kao mediji ili kao reaktant, održavanje termoregulacije, prijenos hranjivih tvari, ali i otpada te izgradnja organskih sustava (Jéquier i Constant, 2009). Prema smjernicama za odrasle (2002) preporučeni dnevni unos tekućine je 1,5 do 2 L vode za osobe s umjerenom aktivnošću. Unos tekućine u svih ispitanika u ovom istraživanju niži je od preporuka. Prosječan dnevni unos ispitanika je 1077,29 L/dan, što je 71,8 % minimalne vrijednosti preporuke za unos vode. Gledano prema skupinama i spolu, žene unose veću količinu tekućine (79,8 % preporuke) u odnosu na muškarce (48,5 % preporuke) pogotovo

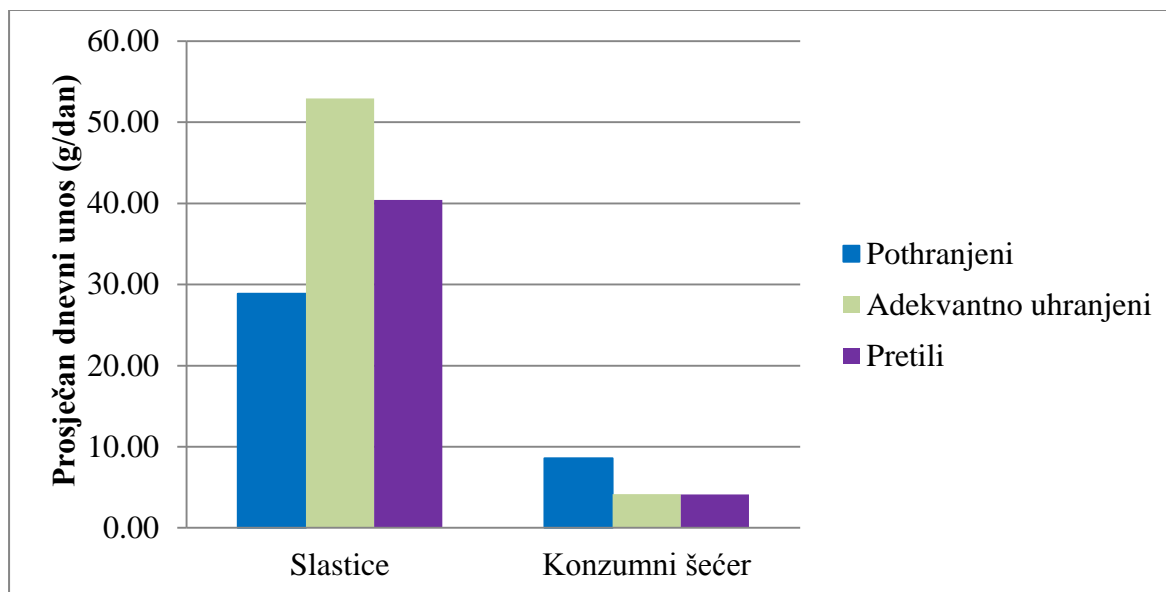
pretile žene (92,6 % preporuke) u odnosu na pretile muškarce (44,7 % preporuke). Osim količine unosa bitno je napomenuti i vrstu tekućine koja se unosi. Već spomenuta voda smatra se najboljim izborom, posebice ukoliko se promatra u odnosu na primjerice, energetska pića, gazirani napitci ili voćni sirupi koji sadrže veliki udio šećera i predstavljaju izvor praznih kalorija koje se povezuju s povećanim rizikom od pretilosti. Istraživanje na pretilim ispitanicima ukazalo je da zamjena unosa sokova bogatih šećerom s vodom može biti povezana s gubitkom tjelesne mase (Pan i sur., 2013).

Povećani unos soli može dovesti do hipertenzije te kardiovaskularnih oboljenja. Mogući put djelovanja uključuje autoimuni odgovor preko $T_{17}C$ stanica koja se povezuju sa crijevnom mikrobiotom. Utjecaj većeg unosa soli na crijevnu mikrobiotu nije dovoljno istražen međutim istraživanja na životinjama te pilot studija na ljudima ukazala je na njihovu moguću vezu, jer je povećanje unosa soli u ljudi izazivao smanjenje *Lactobacillus spp.* u crijevima (Wilck i sur., 2017). Na pitanje dosoljavaju li ispitanici hranu utvrđeno je da većina pothranjenih (53,8 %), adekvatno uhranjenih (80,0 %) i pretilih (76,4 %) ne dosoljava, međutim analizom unosa Na^+ utvrđeno je da sve skupine unose veće količine od preporučenog unosa koji iznosi 1,5 g/dan (USDA, 2007) što je prikazano na slici 17. Najveći unos soli u pretiloj populaciji mogao bi potkrijepiti pretpostavku da sol povećava rizik od pretilost (Ma i sur., 2015).



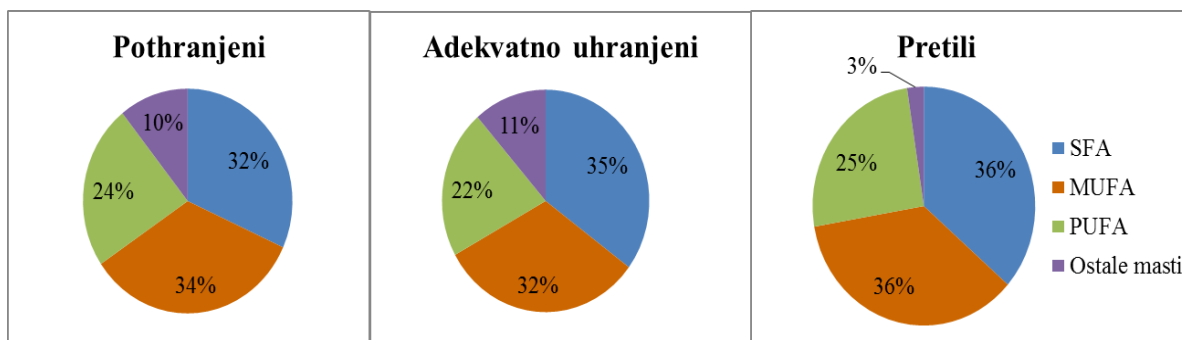
Slika 17. Prikaz prosječnog unosa natrija s obzirom na ITM (*ružičasto=USDA preporuka za dnevni unos (DRI-1,5 mg/dan).

Unos šećera u ispitanika prikazan je na slici 18. Analizom trodnevnih dnevnika prehrane razdijeljen je unos slastica i dodanog šećera. Najviše slastica unose adekvatno uhranjeni ispitanici (52,93 g/dan), a dodani šećer najviše unose pothranjeni ispitanici (8,59 g/dan). S obzirom da se veći unos šećera povezuje s većom pojavnosću pretilosti (Bray i Popkin, 2014) ovo nije očekivani rezultat.



Slika 18. Prikaz prosječnog dnevnog unosa slastica naspram konzumnog šećera kod ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti.

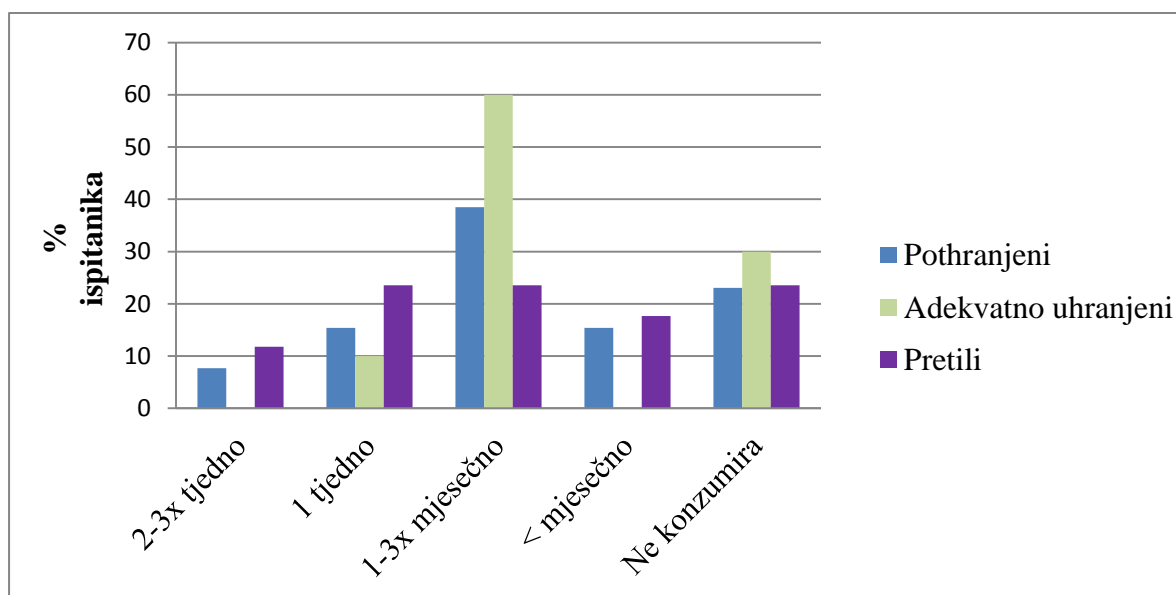
U ukupnom unosu masti važno je uzeti u obzir postotak pojedinih vrsta masnih kiselina. Dok se mononezasićene masne kiseline (MUFA, *engl. Monounsaturated Fats*) i polinezasićene masne kiseline (PUFA, *engl. Polyunsaturated Fats*) povezuju s pozitivnim učinkom na zdravlje, za unos zasićenih masnih kiselina (SFA, *engl. Saturated Fats*) se preporučuje unos niži od 10% ukupnog energetskeg unosa. Udio pojedinih masnih kiselina u njihovom ukupnom unosu prikazan je na slici 19 iz čega je vidljivo da nema značajne razlike u unosu različitih vrsta masnih kiselina između skupina s obzirom na stupanj uhranjenosti. Sve skupine unosile su SFA više nego što se preporučuje (pretili 15% ukupnog energetskeg unosa, adekvatno uhranjeni 14 %, pothranjeni 13 %), što je karakteristika zapadnjačkog tipa prehrane.



* SFA – zasićene masne kiseline; MUFA – mononezasićene masne kiseline; PUFA – polinezasićene masne kiseline

Slika 19. Udio masnih kiselina u ukupnom dnevnom unosu masti u ispitanika s obzirom na stupanj uhranjenosti.

„Brza hrana“ ima veliku energetsku gustoću pa se češći unos povezuje s pojavom pretilosti. Istraživanje navika unosa brze hrane u američkoj populaciji potvrdilo je kako češća konzumacija brze hrane utječe na povećanje tjelesne mase (Pereira i sur., 2005). Analiziranjem učestalosti konzumacije brze hrane prikupljene upitnikom, zabilježeno je kako ispitanici pretežno konzumiraju brzu hranu (75 %). Ispitanici koji konzumiraju brzu hranu najčešće je konzumiraju 1-3x mjesečno, a to se pogotovo odnosi na adekvatno uhranjene ispitanike (čak 60 %). U pretiloj skupini 76,5 % ispitanika konzumira brzu hranu, no nije zabilježena karakteristična učestalost konzumacije brze hrane već je definirana pojedinačnom preferencijom. Od ispitanika koji ne konzumiraju brzu hranu, 21 % su pothranjeni i 22 % pretili te 30 % adekvatno uhranjeni ispitanici (slika 20).

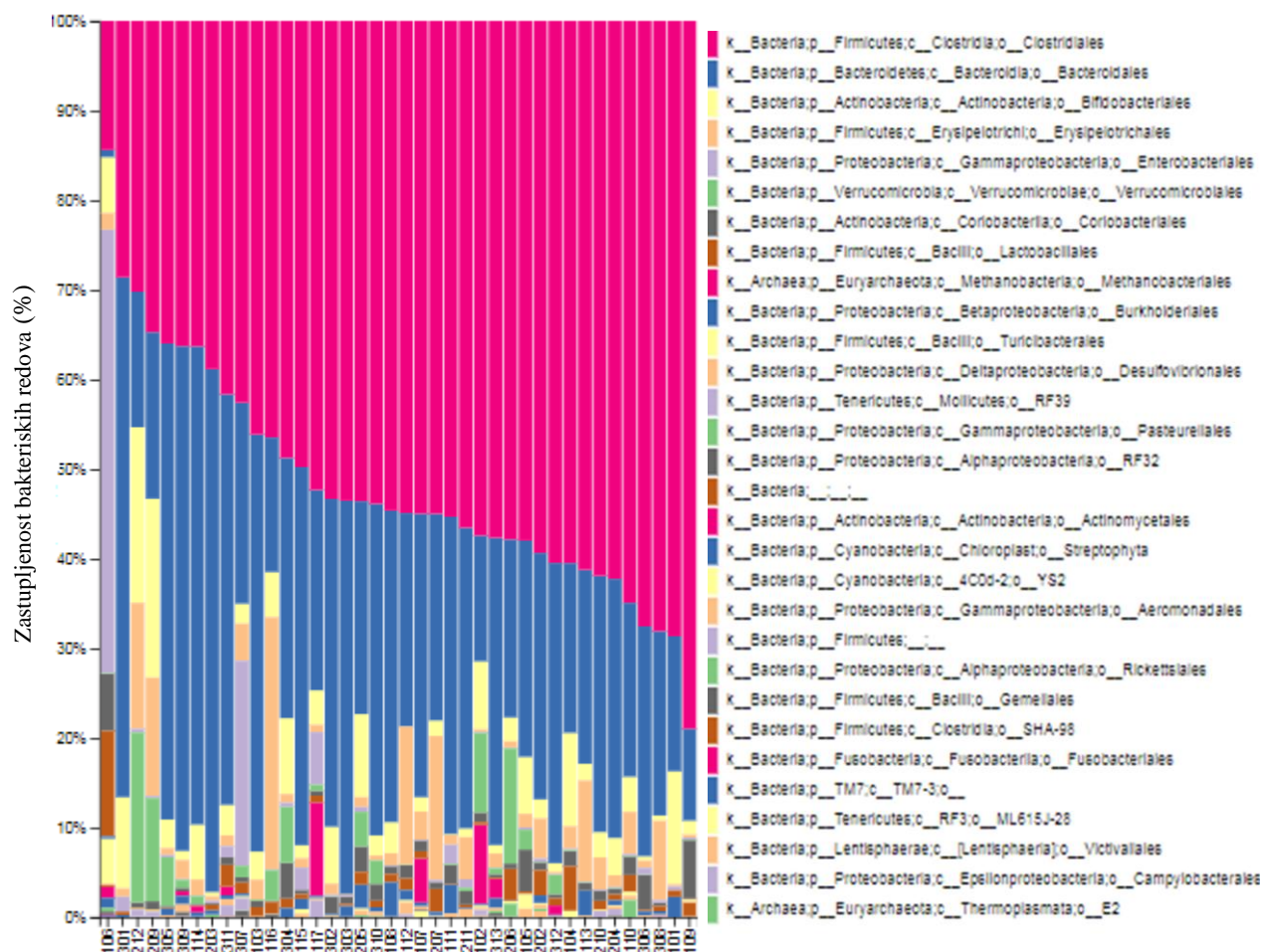


Slika 20. Učestalost konzumacije brze hrane na mjesečnoj razini u ispitanika prikazano prema stupnju uhranjenosti.

Iako se prehrambene navike svih skupina ispitanika ne razlikuju mnogo, generalno prehrana ispitanika ima značajke zapadnjačke prehrane za koju se pokazalo da utječe sa sastav crijevne mikrobiote, a neznatne razlike u prehrani između pojedinaca te ostalih ispitanika moglo bi se povezati s razlikom u sastavu crijevne mikrobiote.

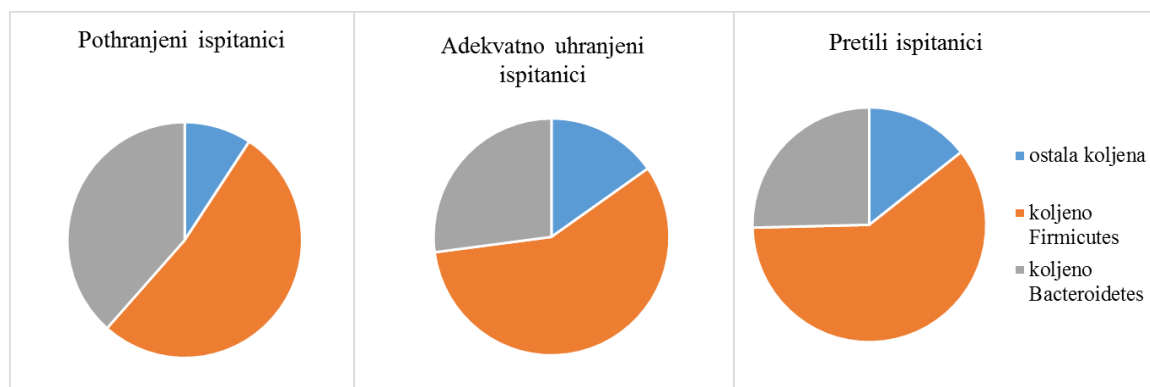
4.3. PODACI DOBIVENI ANALIZOM CRIJEVNE MIKROBIOTE

Crijevnu mikrobiotu karakterizira velika bioraznolikost mikroorganizama. Do sada su priznata 52 koljena bakterija od kojih pet do sedam koljena nastanjuju gastrointestinalni trakt sisavaca. Općenito, koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* dominiraju u crijevima mikrobioloških zajednica, dok su članovi *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* rijede prisutni (Shin i sur., 2015). Taksonomski sastav crijevne mikrobiote ispitanika prikazan je na slici 21 u obliku stupčastog dijagrama iz čega je vidljiv taksonomski sastav mikrobiote za svaki uzorak na odabranom taksonomskom nivou reda, što ukazuje na kompleksnost i različitost sastava crijevne mikrobiote svakog pojedinca. Taksonomska klasifikacija dobivena je poravnavanjem reprezentativne sekvence svakog OTU-a s Greengenes 16S rRNA bazom podataka.



Slika 21. Taksonomska raznolikost crijevne mikrobiote na nivou reda dobivena analizom uzoraka stolice (ispitanici pod šifrom 100- su pretili; 200- Adekvatno uhranjeni; 300- pothranjeni).

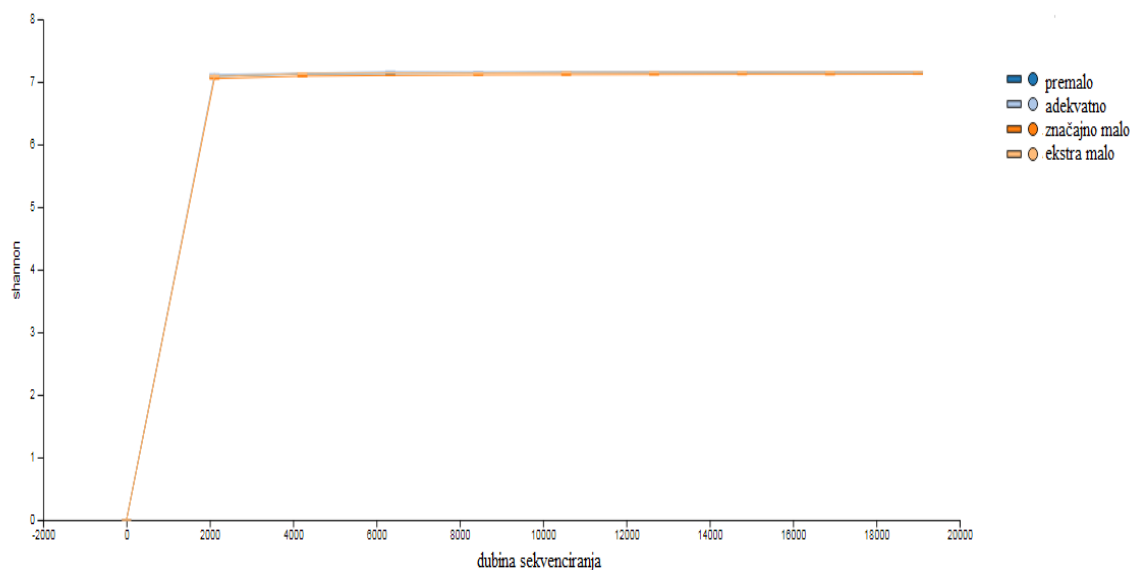
Na slici 22 prikazan je udio najzastupljenijih koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te ostalih koljena bakterija u ukupnom bakterijskom sastavu crijevne mikrobiote kod skupina ispitanika s različitim stupnjem uhranjenosti. U pothranjenoj skupini zamijećen je veći udio koljena *Bacteroidetes* (38,5 %) u usporedbi s adekvatno uhranjenom (27,1 %) te pothranjenom skupinom (25,4 %). Kako se stupanj uhranjenosti u literaturi povezuje s razlikom u omjeru koljena *Firmicutes/Bacteroidetes*, za svaku skupinu je izračunat prosječan omjer navedenih koljena. Najveći omjer *Firmicutes/Bacteroidetes* je u pretilih ispitanika (prosječna vrijednost omjera = 2,32) potom u skupini adekvatno uhranjenih ispitanika (prosječna vrijednost omjera = 2,13), a najmanji omjer je kod pothranjenih ispitanika (prosječna vrijednost omjera = 1,59). Istraživanje na Ukrajinskoj populaciji pokazalo je slične rezultate, gdje je također zamijećen veći omjer koljena *Firmicutes/Bacteroidetes* kod ispitanika s višim stupnjem uhranjenosti (Koliada i sur., 2017).



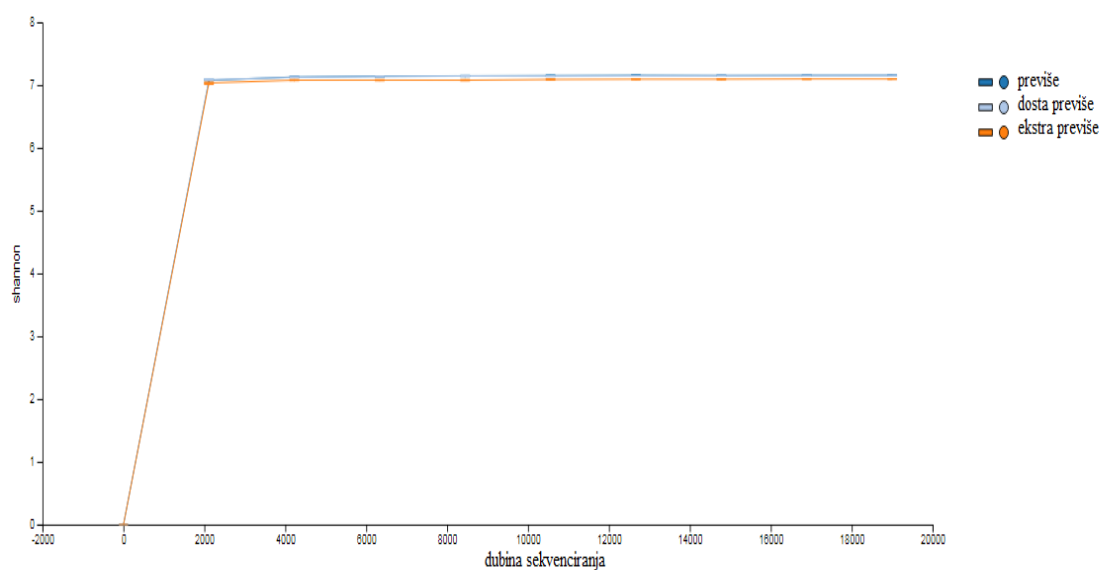
Slika 22. Udio *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i ostalih koljena bakterija u skupina ispitanika s različitim stupnjem uhranjenosti.

Od genomičkih analiza promatrani su još alfa i beta raznolikost. Alfa raznolikost opisuje bogatstvo vrsta unutar pojedinog uzorka, odnosno broj vrsta u svakom pojedinom uzorku. Za određivanje raznolikosti vrsta primijenjen je Shannonov indeks raznolikost koji se bazira na odnosu broja vrsta i njihove zastupljenosti (relativne brojnosti) u uzorku. Alfa raznolikosti prikazana je pomoću regresijskih krivulja na slikama 23-26. Na krivuljama je prikazana ovisnost Shannonovog indeksa o broju sekvenci koje su korištene da bi se procijenio broj vrsta. Veća vrijednost Shannonovog indeksa upućuje na veći broj vrsta u uzorku.

Pomoću alfa raznolikosti ispitivan je utjecaj unosa makronutrijenata; ugljikohidrata, proteina, masti te vlakana na raznolikost crijevne mikrobiote pojedinog ispitanika. Rarefakcijske krivulje uzoraka grupiranih na osnovu unosa ugljikohidrata i masti nisu pokazale razliku između raznolikosti vrsta u pothranjenih, adekvatno uhranjenih i pretilih pojedinaca što se može vidjeti na slikama 23 i 24.

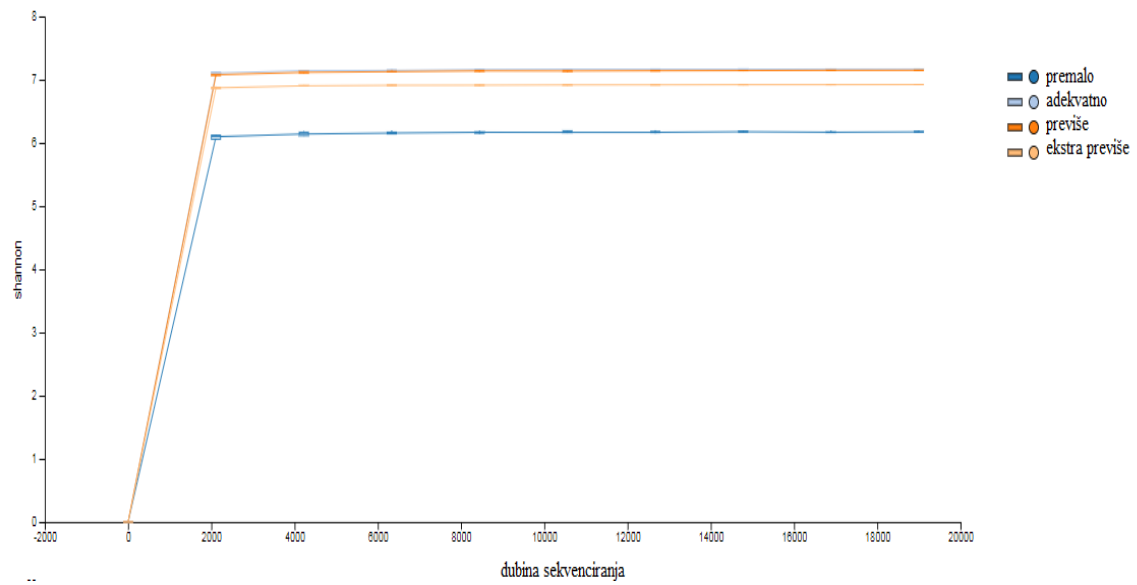


Slika 23. Prikaz rarefakcijskih krivulja u ovisnosti o unosu ugljikohidrata.

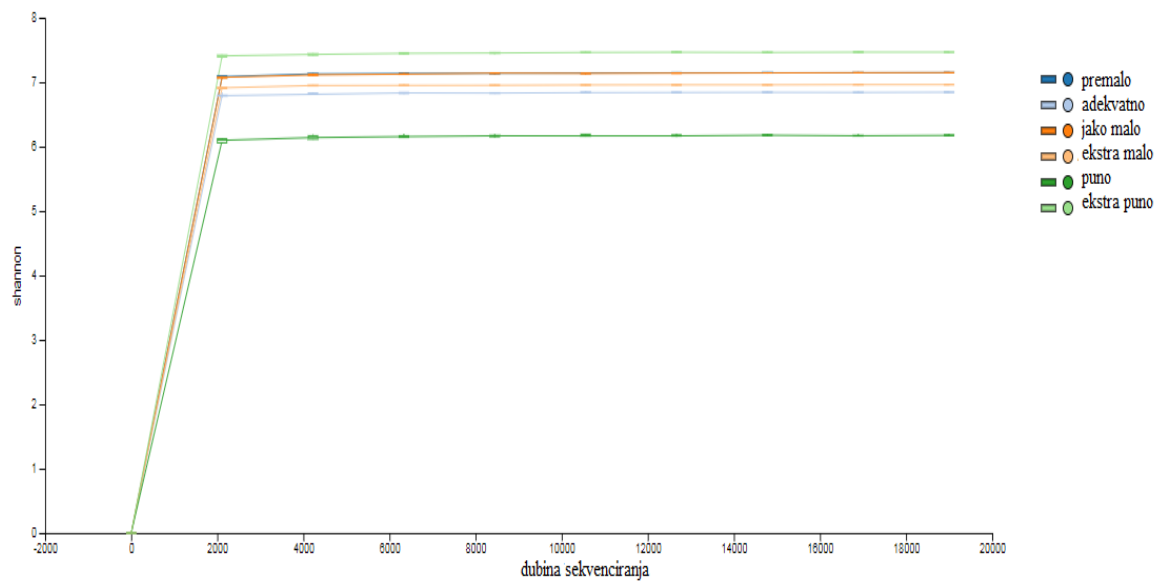


Slika 24. Prikaz rarefakcijskih krivulja u ovisnosti o unosu masti.

Kod rarefakcijskih krivulja unosa proteina zamijećene su razlike u raznolikosti crijevne mikrobiote u pojedinaca s različitim unosom proteina. Kod jednog ispitanika čiji je unos proteina bio niži od preporuke ($<10\%$ od ukupnog energetskeg unosa) zamijećen je niži Shannonov indeks (6,0), dok u pojedinaca s adekvatnim unosom i višim unosom proteina ($>10\%$ od ukupnog energetskeg unosa) Shannonov indeks je iznosio oko 7,0 (slika 25). Također, rarefakcijske krivulje uzoraka grupiranih na osnovu unosa vlakana pokazale su različitu raznolikost vrsta crijevne mikrobiote u ispitanika s većim unosom vlakana (19,48 g na 1000 kcal dnevno) i najvećim unosom (27,11g na 1000 kcal dnevno) u odnosu na ostale ispitanike s nižim te adekvatnim unosom vlakana (od minimalnog unosa od 3,88 g do 17,25 g vlakana na 1000 kcal). Ispitanik s većim unosom vlakana imao je nižu raznolikost vrsta u odnosu na ostale ispitanike (Shannonov indeks = 6). Isti ispitanik izdvojen je kod rarefakcijski krivulja grupiranih na osnovu unosa proteina. Izdvajanje ispitanika u oba slučaja vezana su uz energetskegi unos koji je dvostruko niži od preporuka (1105,45 kcal) što ukazuje općenito na nedovoljni unos hrane. Najveći unos vlakana, koji je gotovo dvostruko veći od preporuke, imao je samo jedan ispitanik sa Shannonovim indeksom od 7,3. Njegova prehrana karakteristična je po visokom unosu voća i povrća (220,5% od preporuke) te visokom udjelu cjelovitih žitarica u ukupnom unosu žitarica (53,5% unosa žitarica su cjelovite žitarice). Rezultat je u skladu s istraživanjem prehrane i crijevne mikrobiote u Afričke i Europske djece. U afričke djece, čija prehrana je imala viši unos prehrambenih vlakana, zabilježena je veća bioraznolikost vrsta fekalne mikrobiote. (De Filippo i sur., 2010).

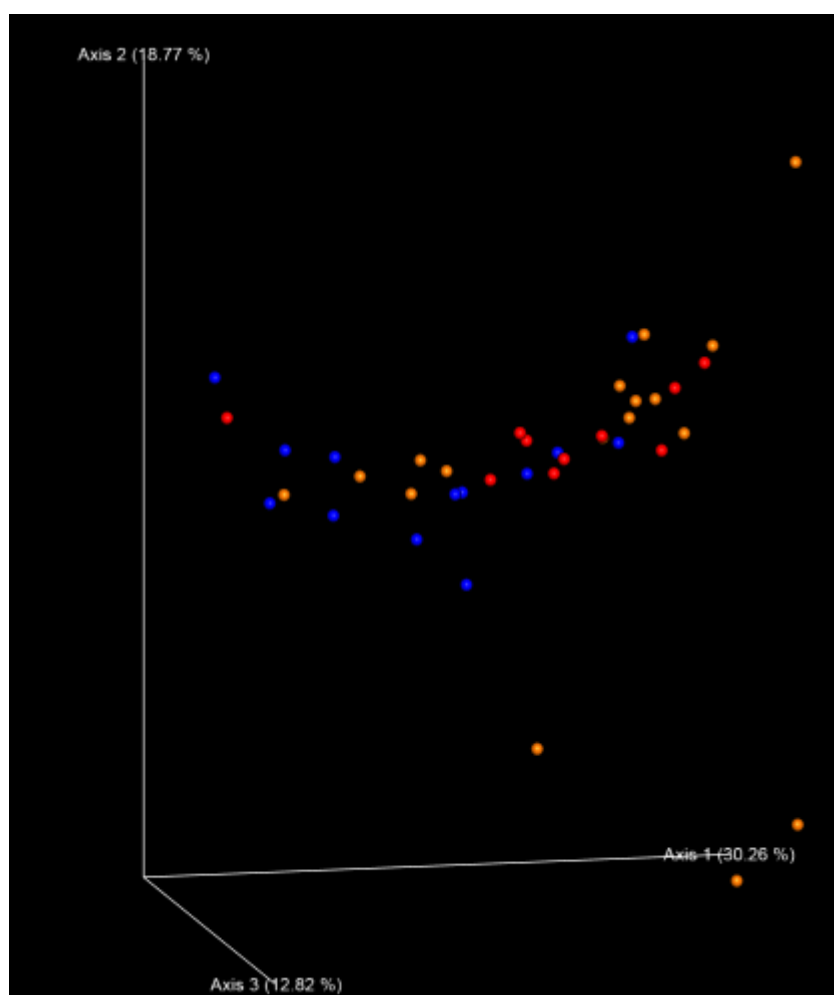


Slika 25. Prikaz rarefakcijskih krivulja u ovisnosti o unosu proteina.



Slika 26. Prikaz rarefakcijskih krivulja u ovisnosti o unosu vlakana u gramima na 1000 kcal.

Beta raznolikost predstavlja raznolikost između uzoraka uključenih u analizu. Za usporedbu sastava mikrobiote između svih uzoraka izabrana je osnovna koordinatna analiza („Principal Coordinates Analysis“ - PCoA). PCoA metoda smješta uzorke u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti koja je određena metrikom, što je vidljivo na slici 27. Kod UniFrac metrike, koja je korištena u ovom radu, razlikuje se težinska i netežinska UniFrac metrika. Težinska UniFrac metrika je kvantitativna metrika koja obuhvaća prisutnost i zastupljenost samih taksonomskih grupa, dok je netežinska UniFrac metrika kvalitativna metrika te uzima u obzir samo prisutnost ili odsutnost taksonomskih grupa. Na osnovu rezultata beta raznolikosti dobivenih težinskom Unifrac metrikom vidljivo je da sastav i zastupljenost različitih mikrobnih vrsta ne omogućava razdvajanje promatranih uzoraka na osnovu ITM-a.



Slika 27. Beta raznolikost crijevne mikrobiote ispitanika prikazana težinskom UniFrac metrikom (plavi krugovi = pothranjeni ispitanici, narančasti krugovi = adekvatno uhranjeni ispitanici, crveni krugovi = pretili ispitanici).

Analiza prehrane nije pokazala specifičnost u unosu energije, makronutrijenata te promatranih skupina namirnica, izuzev mlijeka i mliječnih proizvoda, kojima bi se objasnilo izdvajanje pojedinih uzoraka, no analiza sastava mikrobiote ukazala je na razlike u sastavu između ispitanika.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja te analize rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Pretili, adekvatno uhranjeni te pothranjeni ispitanici mlađe životne dobi nemaju statistički značajnu razliku u unosu energije, makronutrijenata i prehrambenih vlakana procijenjenu trodnevnim dnevnikom prehrane.
2. Usporedbom s hrvatskim prehrambenim preporukama utvrđeno je da ispitanici svih promatranih skupina unose nedovoljno ugljikohidrata, višak masti te adekvatnu količinu proteina.
3. Između skupina pothranjenih, adekvatno uhranjenih te pretilih ispitanika nije zamijećena statistički značajna razlika u prosječnom unosu skupina: voće i povrće (g/dan); žitarice (g/dan); meso i mesni proizvodi (g/dan); masti i ulja (g/dan); te u unosu ukupne tekućine (L/dan). Jedina statistički značajna razlika ($p=0,046$) zamijećena je u prosječnom dnevnom unosu mlijeka i mliječnih proizvoda (mL/dan) između skupina, gdje pothranjeni značajno prednjače.
4. Uzimajući u obzir hrvatske Smjernice za odrasle, jedina zadovoljena preporuka je dovoljan unos voća i povrća u pothranjenih te adekvatno uhranjenih ispitanika; prema svim ostalim preporukama ispitanici unose premalo (namirnice koje blagotvorno utječu na organizam, npr. cjelovite žitarice, mliječni proizvodi i sl.) ili u suvišku (namirnice koje se povezuju s rizikom za razvoj kroničnih oboljenja, npr. crveno meso, zasićene masti) što ukazuje na neadekvatnost prehrambenih navika u mladoj populaciji bez obzira na stupanj uhranjenosti.
5. Budući da ispitanici, promatrajući stupanj uhranjenosti, ne provode različite obrasce prehrane i nemaju značajno različite prehrambene navike, koji bi potencijalno mogli utjecati na sastav crijevne mikrobiote, nije pronađena poveznica između prehrane i sastava crijevne mikrobiote u ispitanika mlađe životne dobi s obzirom na stupanj uhranjenosti.
6. U sastavu crijevne mikrobiote između ispitivanih skupina utvrđena je razlika u omjeru *Firmicutes/Bacteroidetes* pri čemu su pretili ispitanici imali viši udio *Firmicutes* u odnosu na *Bacteroidetes*.

Potreban je veći broj ispitanika s većim razlikama u prehrani kako bi se utvrdio statistički značajniji utjecaj prehrane na sastav crijevne mikrobiote zdravih osoba.

6. LITERATURA

Alebić, I. J. (2008) Prehrambene smjernice i osobitosti osnovnih skupina namirnica. *Medicus*, **17**, 37-46.

Al-Nabulsi, A. A., Obiedat, B., Ali, R., Osaili, T. M., Bawadi, H., Abushelaibi, A., Shaker, R. R., Holley, R. A. (2014) Knowledge of probiotics and factors affecting their consumption by jordanian college students. *International Journal of Probiotics & Prebiotics* **9**, 77-86.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180.

Banožić, M., Ljubić, A., Pehar, M., Ištuk, J., Kenjeric, D. Č. (2015) Prehrambene navike studenata Sveučilišta u Mostaru. 8. međunarodni Simpozij “Hranom do zdravlja”. Tuzla, str. 105-112.

Bell, D. S. H. (2015) Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association? *Postgrad. Med.* **127**, 863-868.

Benjamin, J. L., Hedin, C. R. H., Koutsoumpas, A., Ng, S. C., McCarthy, N. E., Prescott, N. J., Pessoa-Lopes, P., Mathew, C. G., Sanderson, J., Hart, A. L., Kamm, M. A., Knight, C., Forbes, A., Stagg, A. J., Lindsay, J. O., Whelan, K. (2011) Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**, 1092-1100.

Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. (2015) Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* **16**, 1599-1600.

Bray, G. A., Popkin, B. M. (2014) Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes care.* **37**, 950-956.

Carvalho-Wells, A. L., Helmolz, K., Nodet, C., Molzer, C., Leonard, C., McKevith, B., Thielecke, F., Jakson, K. G., Tuohy, K. M. (2010) Determination of the *in vivo* prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *Bri. J. Nutr.* **104**, 1353-1356.

Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2014) Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol. Endocrinol.* **28**, 1221-1238.

Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P.W., Cotter, P. D. (2012) The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut microbes.* **3**, 186-202.

Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., O'Reily, C., Jeffery, I. B., Wood-Martin, R., Kerins, D. M., Quigley, E., Ross, R. P., O'Toole, P., Molloy, M. G., Falvey, E., Shanahan, F., Cotter, P. D. (2014) Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* **63**, 1913–1920. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306541.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* **148**, 1258-1270.

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. (2016) Human gut colonisation may be initiated *in utero* by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* **6**, 23129.

Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. (2016) Human gut colonisation may be initiated *in utero* by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci. Rep.* **6**, 23129.

Conlon, M. A., Bird, A. R. (2015) The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients.* **7**, 17-44. doi: 10.3390/nu7010017.

Coolinarika (2018) Recepti, <<http://www.coolinarika.com/recepti/>>. Pristupljeno 01. – 25. travnja 2018.

Costabile, A., Klinder, A., Fava, F., Napolitano, A., Fogliano, V., Leonard, C., Gibson, G. R., Tuohy, K. M. (2008) Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the

human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Bri. J. Nutr.* **99**, 110-120.

Costabile, A., Kolida, S., Klinder, A., Gietl, E., B  uerlein, M., Froberg, C., Landsch  tze, V., Gibson, G. R. (2010) A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara scolymus*) in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **104**, 1007-1017. doi:10.1017/S0007114510001571.

D'Argenio V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97-102.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., Lionetti, P. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **107(33)**, 14691-14696.

Dietary Guidelines for Americans 2015-2020 (2015) U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture, Washington.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *P. Natl. Acad. Sci USA.* **107**, 11971-11975.

EFSA (2010) European Food Safety Authority. EFSA sets European dietary reference values for nutrient intakes. <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/nda100326>>. Pristupljeno 6. rujna 2018.

Ercolini, D., Fogliano, V. (2018) Food design to feed the human gut microbiota. *J.Agr.Food Chem.* **66**, 3754-3758.

Etxeberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F. I., Aguirre, L., Martínez, J. A., Portillo, M. P. (2013) Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *J. Agr.Food Chem.* **61**, 9517-9533.

Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., Duncan, S. H. (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.* **9**, 577.

- Gérard, P. (2016) Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 147-162.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Treuren W. V., Knight, R., Bell J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., Ley, R. E. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, **159**, 789-799.
- Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., Watzl, B. (2015) Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb. Ecol. Health D.* **26**, 26164. doi: 10.3402/mehd.v26.26164
- Gross, G.; Jacobs, D. M., Peters, S., Possemiers, S., van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., van de Wiele, T. (2010) In vitro bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10236–10246.
- Guglielmetti, S., Fracassetti, D., Taverniti, V., Del Bo', C., Vendrame, S., Klimis-Zacas, D., Arioli, S., Riso, P., Porrini, M. (2013) Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. *J. Agr. Food Chem.* **61**, 8134-8140.
- Hamaker, B. R., Tuncil, Y. E. (2014) A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. *J. Mol. Biol.* **426**, 3838-3850.
- Hollister, E. B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology.* **146**, 1449-1458.
- Hooda, S., Boler, B. M. V., Seroo, M. C. R., Brulc, J. M., Staeger, M. A., Boileau, T. W., Scot, E. D., Fahey, G. C., Swanson, K. S. (2012) 454 Pyrosequencing Reveals a Shift in Fecal Microbiota of Healthy Adult Men Consuming Polydextrose or Soluble Corn Fiber–3. *J. Nutr.* **142**, 1259-1265.
- Hrvatski Sabor (2003) Zakon o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine: Konvencije o ljudskim pravima i biomedicini (i o dva dodatna protokola...); NN MU br. 13/2003.

Jelinić, D. J., Pucarín-Cvetković, J., Nola, I. A., Senta, A., Milošević, M., Kern, J. (2009) Regional differences in dietary habits of adult Croatian population. *Collegium antropol.* **33**, 31-34.

Jéquier, E., Constant, F. (2010) Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64**, 115.

Jones, J. M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap’. *Nutr. J.* **13**, 34. doi:10.1186/1475-2891-13-34.

Kabeerdoss, J., Devi, R. S., Mary, R. R., Ramakrishna, B. S. (2012) Faecal microbiota composition in vegetarians: comparison with omnivores in a cohort of young women in southern India. *Bri. J. Nutr.* **108**, 953-957.

Kaić-Rak, A., AntoniĆ, K. (1990) Tablice o sastavu namirnica i pića. Zavod za zaštitu zdravlja SR Hrvatske, Zagreb.

Kendall, C. W., Esfahani, A. Jenkins, D. J. (2010) The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids* **24**, 42-48.

Klinder, A., Shen, Q., Heppel, S., Lovegrove, J. A., Rowland, I., Tuohy, K. M. (2016). Impact of increasing fruit and vegetables and flavonoid intake on the human gut microbiota. *Food Funct.* **7**, 1788-1796.

Knights, D., Ward, T. L., McKinlay, C. E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014) Rethinking „enterotypes“. *Cell host microbe.* **16**, 433-437.

Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D. DiDonato, J., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H. W., Bushman, F D., Lusi, A. J., Hazen, S. H. (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* **19**, 576-585.

Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., Vaiserman, A. (2017) Association between body mass indeks and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BMC. Microbiol.* **17**, article number 120.

Koprivnjak, J. (2008) Prehrambene navike mladih i promocija zdravlja *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* **4**.

Lange, K., Buerger, M., Stallmach, A., Bruns, T. (2016) Effects of antibiotics on gut microbiota. *Digest. Dis.* **34**, 260-268.

Lewis, S. J., Heaton, K.W. (1997) Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 920-924.

Liszt, K., Zwielehner, J., Handschur, M., Hippe, B., Thaler, R., Haslberger, A. G. (2009) Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCRDGGE fingerprinting. *Ann. Nutr. Metab.* **54**, 253-257.

Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature.* **489**, 220-230.

Ludwig, I. A., Paz de Peña, M., Concepción, C. (2013) Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *Biofactors.* **39**, 623-632.

Ma, Y., He, F. J., MacGregor, G. A. (2015) High salt intake: independent risk factor for obesity?. *Hypertension.* **66**, 843-849.

Matijašić, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., Rogelj, I. (2014) Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur. J. Nutr.* **53**, 1051-1064.

Meijnikman, A. S., Gerdes, V. E., Nieuwdorp, M., Herrema, H. (2017) Evaluating Casuality of Gut Microbiota in Obesity and Diabetes in Humans. *Endocr. Rev.* **39**, 133-153.

Mills, C. E., Tzounis, X., Oruna-Concha, M. J., Mottram, D. S., Gibson, G. R., Spencer, J. P. (2015) In vitro colonic metabolism of coffee and chlorogenic acid results in selective changes in human faecal microbiota growth. *Brit. J. Nutr.* **113**, 1220-1227. doi:10.1017/S0007114514003948

Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., Prajapati, J. (2015) Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J. Agr. Food Chem.* **63**, 3615-3626. doi:10.1021/jf506326t.

Mitsou, E. K., Kougia, E., Nomikos, T. Z., Yannakoulia, M., Mountzouris, K. C., Kyriacou, A. (2011) Effect of banana consumption on faecal microbiota: a randomised, controlled trial. *Anaerobe*. **17**, 384-387.

Molanorouzi, K., Khoo, S., Morris, T. (2015) Motives for adult participation in physical activity: type of activity, age, and gender. *BMC public health* **15**, 66.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anvari, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. D., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Hussein, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E. A. M., Kengne, A. P., Khader, J. S., Khang, Y., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. M., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, V., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, S. X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, Y. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C., Abraham, J. P. (2014) Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. **384**, 766-781.

Odluka o standardu prehrane bolesnika u bolnicama (2015) *Narodne novine* **59**, Zagreb.

Omron (2007) Manual for Body Composition Monitor BF-500. OMRON Health Europe B.V. Hoofddorp, Nizozemska

- Ou, J., Carbonero, F., Zoetendal, E. G., DeLany, J.P., Wang, M., Newton, K., Gaskins, H. R., O'Keefe, J. D. S. (2013) Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* **98**, 111-20.
- Pan, A., Malik, V. S., Hao, T., Willett, W. C., Mozaffarian, D., Hu, F. B. (2013). Changes in water and beverage intake and long-term weight changes: results from three prospective cohort studies. *Int. J. Obesity.* **37**, 1378.
- Pereira, M A., Kartashov, A. I., Ebbeling, C. B., Van Horn, L., Slattery, M. L., Jacobs, D. R., Ludwig, D. S., (2005) Fat-food habits, weightgain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet.* **365**, 34-42.
- Prehrambene smjernice za odrasle (2002) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb.
- Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Diaz, F. C., Andrés-Lacueva, C., Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 1323-1334.
- Raimondi, S., Anighoro, A., Quartieri, A., Amaretti, A., Tomás-Barberán, F. A., Rastelli, G., Rossi, M. (2015) Role of bifidobacteria in the hydrolysis of chlorogenic acid. *MicrobiologyOpen* **4**, 41-52. Doi:10.1002/mbo3.219
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, M., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., Marchesi, J. R., Collado, M. C. (2015) The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health D.* **26**, 651-2235.
- Rouhani, M. H., Salehi-Abargouei, A., Surkan, P. J., Azadbakht, L. (2014) Is there a relationship between red or processed meat intake and obesity? A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Obes. Rev.* **15**, 740-748.
- Round, J. L., Mazmanian, S. K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313.
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrone, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini M., Fiori, J., Gotti, R., De Bellis, G., Luiselli, D., Brigidi, P., Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A. G., Crittenden, A. N. (2014) Gut

microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* **5**, 3654. doi: 10.1038/ncomms4654.

Schoenfeld, B. J., Aragon, A. A., Krieger, J. W. (2015) Effects of meal frequency on weight loss and body composition: a meta-analysis. *Nutr. Rev.* **73**, 69-82.

Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859-904.

Shay C. M., Van Horn, L., Stamler, J., Dyer, A. R., Brown, I. J., Chan, Q., Miura, K., Zhao, L., Okuda, n., Daviglus, M. L., Elliott, P., (2012) Food and nutrient intakes and their associations with lower BMI in middle-aged US adults: the International Study of Macro/Micronutrients and Blood Pressure (INTERMAP). *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 483–491.

Sheflin, A. M., Melby, C. L., Carbonero, F., Weir, T. L. (2017) Linking dietary patterns with gut microbial composition and function. *Gut Microbes* **8**, 113-129.

Shin, N. R., Whon, T. W., Bae, J. W. (2015) Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* **33**, 496-503.

Shinohara, K., Ohashi, Y., Kawasumi, K., Terada, A., Fujisawa, T. (2010). Effect of apple intake on fecal microbiota and metabolites in humans. *Anaerobe*. **16**, 510-515.

Sommer, F., Bäckhed, F.(2013). The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 227-238.

Štalić, Z., Sorić, M., Mišigoj-Duraković, M. (2016) Sportska prehrana. Znanje, Zagreb.

Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. **489**, 242-249.

Tuddenham, S., Sears, C. L., (2015) The Intestinal Microbiome and Health. *Curr. Opin. Infect. DiS.* **28(5)**, 464.

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. **457**, 480-484.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2007. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Nutrient Data Laboratory Home Page, <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>. Pristupljeno 9. rujna 2018.

Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R. Y., Joossens, M., Raes, J. (2015) Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*. **65**, 57-62.

Vendrame, S., Guglielmetti, S., Riso, P., Arioli, S., Klimis-Zacas, D., Porrini, M. (2011) Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *J. Agr. Food Chem.* **59**, 12815-12820.

Warburton, D. E. R., Nicol, C. V., Bredin, S. S. (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *Can. Med. Assoc. J.* **174**, 801-809.

WHO (2006) Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ). WHO - World Health Organization, <http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Pristupljeno 19. rujna 2018.

Wilck, N., Matus, M. G., Kearney, S. M., Olesen, S. W., Forslund, K., Bartolomaeus, H., Haase, S., Mähler, A., Balogh, A., Markó, L., Vvedenskaya, O., Kleiner, F. H., Tsvetkov, D., Klung, L., Costea, P. I., Sunagawa, S., Maier, L., Rakova, N., Schatz, V., Neubert, P., Frätzer, C., Krannich, A., Gollasch, M., Grogme, A. D., Côte-Real, B. F., Geralch, R. G., Basic, M., Typas, A., Wu, C., Titze, J. M., Jantsch, J., Boschmann, M., Dechend, R., Kleinewietfeld, M., Kempa, S., Bork, P., Linker, R. A., Alm, E. J., Müller, D. N. (2017) Salt-responsive gut commensal modulates T H 17 axis and disease. *Nature*. **551**, 585.

Wu, G. D., Compher, C., Chen, E. Z., Smith, S. A., Shah, R. D., Bittinger, K., Chehoud, C., Albenberg, L. G., Nessel, L., Gilroy, E., Star, J., Weljie, A. M., Flint, H. J., Metz, D. C., Bennett, M. J., Li, H., Bushman, F. D., Lewis, J. D. (2014) Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, **65**, 63-72.

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A.

C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., Gordon J. I. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222.

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., Rusch, K., Klosterhalfen, S., Enck, P. A. (2012) Vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 53-60.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Samodol